

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Prevalencia de Malaria Aviar en las aves más comunes del Parque Recreacional-Bosque

Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada

en Ciencias Biológicas

Daniela Carolina Bahamonde Vinuesa

Quito, 2014

CERTIFICADO

Yo, Tjitte de Vries, Director de la disertación, CERTIFICO: Que la señora DANIELA CAROLINA BAHAMONDE VINUEZA ha realizado la investigación sobre el tema “Prevalencia de Malaria Aviar en las aves comunes del Parque Recreacional-Bosque Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador” de acuerdo a las normas y técnicas establecidas. Una vez concluido el trabajo, conforme con las disposiciones reglamentarias, autorizo la presentación del informe respectivo.

Quito, 26 de Octubre del 2014

.....

DIRECTOR

A mis dos hermosas hijas Intuisak, Inkudel,

A mi esposo Liveredo,

A mis padres, hermano y hermanas

y familia más cercana

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis ha logrado realizarse con la ayuda, de una u otra forma, de varias personas. Quiero expresar mis agradecimientos a la Universidad Tecnológica Indoamérica, al personal de su laboratorio de molecular, Diana Flores y Nicolás Peñafiel y en especial a la Dra. Elisa Bonaccorso, por el apoyo no solamente económico sino también, por abrirme sus puertas, permitirme el uso de las instalaciones, por su conocimiento impartido, por su amistad brindada y sobre todo por la dirección de tesis. Al Gobierno Provincial de Pichincha por el permiso otorgado para trabajar en el Bosque Protector Jerusalem y a su administrador Ing. Ángel Orellana. Quiero agradecer también a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por el conocimiento proporcionado durante mi carrera, al Dr. Tjitte de Vries por su sincera amistad brindada a lo largo de mi carrera universitaria, por su paciencia al entregar su conocimiento y por su dirección en el presente estudio. Agradezco a todos los asistentes de campo. A la Lic. Francisca Hervas por la ayuda brindada en los análisis. Quisiera expresar un agradecimiento especial a Héctor Cadena, por su ayuda en el campo, por apoyarme durante toda la carrera y también durante la realización del presente trabajo, porque siempre estuvo ahí incluso en los malos momentos y siempre ha compartido mis gustos y amor hacia la naturaleza.

Quiero agradecer también a Dios, a mis padres que siempre me han brindado su amor, consejos, conocimiento, sabiduría y ayuda durante no solo este trabajo sino durante toda la época de estudios, por siempre haber confiado en mí y por apoyarme en las decisiones que he tomado. Gracias a mi familia que siempre ha estado ahí en los buenos y malos momentos, por

el apoyo brindado. Finalmente gracias a mis amigos y compañeros por el tiempo compartido dentro y fuera de las aulas.

¡Gracias a todos!

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	3
3.	INTRODUCCIÓN	5
	3.1 Antecedentes	5
	3.1.1. Malaria Aviar	6
	3.1.2 Factores fisiológicos y ecológicos relacionados a las infecciones de malaria aviar	9
	3.1.3. Malaria aviar en el neotrópico y en el Ecuador	10
	3.2. Justificación	11
	3.3. Objetivo general	13
	3.4. Objetivos específicos	13
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
	4.1. Área de estudio	14
	4.2. Captura y procesamiento	14
	4.3 Microscopia y conteo de células	15
	4.4 Extracción y amplificación de ADN	16
	4.5 Prevalencia de infecciones de malaria aviar	17
	4.5.1. Relación de la prevalencia con factores fisiológicos y ecológicos	17

4.6	Intensidad de infecciones de malaria aviar	20
4.6.1	Relación de la Intensidad con factores fisiológicos	21
5.	RESULTADOS	22
5.1	Prevalencia de infecciones de malaria aviar	22
5.1.1.	Relación de la prevalencia con factores fisiológicos y ecológicos	23
5.2.	Intensidad de infecciones de malaria aviar	24
6.	DISCUSIÓN	26
6.1.	Prevalencia de malaria aviar en el Bosque Protector Jerusalem	26
6.1.1.	Diferencias en los métodos de diagnóstico.....	27
6.1.2	Diferencias de prevalencia entre especies el factor filogenético	30
6.1.3.	Relación de prevalencia con factores fisiológicos y ecológicos.....	32
6.2.	Intensidad de infecciones de malaria aviar	36
6.2.1.	Diferencias de intensidad de infección entre especies	36
6.2.2.	Relación de intensidad con factores fisiológicos	37
6.3.	Conclusiones y Recomendaciones.....	38
7.	LITERATURA CITADA	40
8.	FIGURAS	52
9.	TABLAS.....	67
10.	ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de un haemosporidio.....	53
Figura 2. Ubicación geográfica del área de estudio.	54
Figura 3. Puntos de muestreo dentro del BPJ.....	55
Figura 4. Recolección de datos.....	56
Figura 5. Frotis sanguíneos observados bajo microscopio a aumento de 40 x.....	57
Figura 6. Producto de PCR en gel de Agarosa al 1%.....	58
Figura 7. Filogenia del gen ND2..	59
Figura 8. Árbol filogenético de las especies de interés..	60
Figura 9: Hospederos..	61
Figura 10: Correlación de Pearson para los análisis de relación de la estructura filogenética (raíz cuadrada de la suma de los largos de rama) con prevalencia, peso y abundancia (valor absoluto del contraste estandarizado)..	62
Figura 11. Comparación múltiple de intensidad por especie..	63
Figura 12. Correlaciones de Pearson entre intensidad y condición física por especie..	64
Figura 13. Correlaciones de Pearson entre la intensidad y el número de policromatófilos	65
Figura 14. Relación entre Peso y Prevalencia..	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de malaria.....68

Tabla 2. Comparación múltiple de intensidad por especies..69

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Número de individuos capturados por especie y recapturas.....	71
Anexo 2. Protocolo para tinción GIEMSA.	73
Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN con tiocianato de guanidina para muestras de sangre de aves - ExtADN01.	74
Anexo 4. Composición del “coctel” de PCR y programa de amplificación.....	76
Anexo 5. Lista de especies y sus secuencias de ND2 (número de acceso de GenBank), utilizadas en el análisis filogenético.	78
Anexo 6 Bibliografía de variables ecológicas por especie	79
Anexo 7. Número de células infectadas por individuo por especie..	80
Anexo 8. Secuencias de parásitos.....	85

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas están entre las principales causas de mortalidad de las aves, amenazan su conservación y pueden tener efectos en su fisiología y/o ecología. La malaria aviar es una infección causada por parásitos Haemosporidia, (*Haemoproteus* y *Plasmodium*), que infectan la sangre utilizando como vectores a insectos dípteros. Cuando las aves se infectan, su inmunidad, condición física y reproducción se ven afectadas. Este estudio analiza las infecciones de malaria en las aves comunes del Parque Recreacional Bosque Protector Jersulem (BPJ) durante un periodo de 6 meses. Se comparan dos métodos de diagnóstico (microscopía y molecular por PCR) y se analiza como varía la prevalencia (número de individuos infectados para el número de individuos analizados por especie) entre nueve especies en el contexto de diversas variables. También se analizan las diferencias de intensidad (número de células infectadas por cada 10.000 eritrocitos) entre especies. Finalmente, se analiza la correlación entre intensidad de infección y condición física, y entre intensidad y número de eritrocitos jóvenes (policromatófilos), dentro de cada especie. Los resultados muestran una prevalencia alta de malaria (40,5%, n = 180) en la comunidad de aves del BPJ. Esta prevalencia es la más alta registrada hasta la fecha en Ecuador. El ave con mayor prevalencia por microscopía fue *Columbina passerina* (100%, n = 20), seguida de *Phrygilus plebejus* (90% n = 20), y de *Zonotrichia capensis* (80% n = 20). Por PCR el ave con más prevalencia siguió siendo *Columbina passerina* (80% n = 20), seguida de *Zonotrichia capensis* (75% n = 20) y *Phrygilus plebejus* (65% n = 20). Estudiando las variables que tienen un efecto sobre la prevalencia entre especies, los resultados sugieren que a mayor peso, mayor prevalencia; a mayor abundancia, mayor prevalencia; a menor altura de forrajeo, mayor prevalencia; y a mayor gregarismo, mayor prevalencia. Además se encontró una diferencia

significativa en intensidad de infección entre todas las especies. Sin embargo, no se encontró una correlación significativa entre intensidad y policromatófilos, y entre intensidad y condición física. Cabe destacar que las especies que tuvieron mayor intensidad de infección fueron también las que tuvieron mayores prevalencias.

Palabras clave: Bosque Protector Jerusalem, ecología, fisiología, Haemosporidia, malaria aviar, microscopía, PCR, prevalencia.

2. ABSTRACT

Infectious diseases are the main causes of mortality in birds. They are important in conservation of bird populations and may have effects on the physiology and/or ecology of individuals. Avian malaria is an infection caused by Haemosporidia parasites (*Haemoproteus* y *Plasmodium*) that infect blood, using dipteran insects as vectors. When birds are infected, their immunity, body condition, and reproduction are affected. This study analyzes malaria infections on some common birds at Parque Recreacional Bosque Protector Jersulem (BPJ) during a 6 month period. Two diagnostic methods are compared: microscopy and molecular (PCR based). This study analyzes the variation of prevalence (number of individuals infected over number of individuals analyzed) among species in the context of diverse variables, as well as the differences in infection intensity (number of cells infected in 10,000 cells scanned) between species. Finally, it explores the correlation between infection intensity and body condition, and intensity of infection and number of immature erythrocytes (polychromatophiles), within species. Results show a high malaria prevalence (40,5%, n = 180) on BPJ's bird community. This prevalence is the highest registered in Ecuador to date. The species with the highest prevalence by microscopy was *Columbina passerina* (100% n = 20), followed by *Phrygilus plebejus* (90% n = 20), and *Zonotrichia capensis* (80% n = 20). By PCR the species with the highest prevalence was also *Columbina passerina* (80% n = 20), followed by *Zonotrichia capensis* (75% n = 20) and *Phrygilus plebejus* (65% n = 20). Studying the variables that have an effect on prevalence among species, results suggest that the higher the weight the higher prevalence; the higher abundance, the higher prevalence; the lowest the foraging level, higher frequency; and greater gregariousness may conduct to higher prevalence. Besides, difference in infection intensity between all the species was statistically

significant. However, no significant correlation was found between level of polycromatophiles and intensity, and between intensity and body condition. The species with the higher intensity of infection were also those with the higher prevalences.

Keywords: Avian malaria, Bosque Protector Jerusalem, ecology, Haemosporidia, avian malaria, microscopy, PCR, physiology, prevalence.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 ANTECEDENTES

El Ecuador es conocido, entre otras razones, por su gran diversidad de aves, con más de 1600 especies (Ridgely y Greenfield, 2001). Sin embargo, a pesar de que existen diversos estudios realizados sobre su ecología, distribución y alimentación (e.g. Greeney *et al.*, 2008; Jahn *et al.*, 1999; Ortiz-Crespo, 2003; de Vries *et al.*, 2012), poco se sabe sobre las enfermedades que estas poseen. Solo en los últimos años se ha incursionado en el estudio de enfermedades aviares. Por ejemplo de Vries *et al.* (2014) iniciaron un estudio que relaciona la dinámica de poblaciones de aves y sus ectoparásitos en el Parque Nacional Yasuní. Igualmente, son contados los trabajos sobre endoparásitos en el país (Harrigan *et al.*, 2014; Munro *et al.*, 2009; Möens, 2010; Alarcón *et al.*, 2008; Paca-Condori, 2012). El estudio de enfermedades es importante ya que estas están entre las principales causas de mortalidad (Freed, 1999; Freed *et al.*, 2005) y constituyen una de las amenazas más importantes a la conservación de las especies (Camacho-Escobar *et al.*, 2009; Íñigo-Elías y Enkerlin-Hoeflich, 2002).

Las enfermedades, en general, pueden afectar la fisiología y el comportamiento de los individuos (Saggese, 2007) y tener efectos ecológicos importantes como la alteración de la cadena trófica y el rompimiento de grupos sociales (Saggese, 2007). En los casos menos graves, estas alteraciones pueden causar la fluctuación estacional de las poblaciones (Altizer *et al.*, 2006), cambiando su demografía y contribuyendo a su declinación (Saggese, 2007). Infecciones severas pueden causar disminuciones graves en el éxito reproductivo y hasta la muerte, provocando declinaciones poblacionales y extinciones (Saggese, 2007).

3.1.1. LA MALARIA AVIAR

La malaria aviar es una infección causada por los parásitos Haemosporidia (parásitos apicomplexos), en particular, los linajes dentro de los géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium* (Atkinson *et al.*, 2008). Si bien *Leucocitozoon* pertenece al mismo orden que los anteriores, filogenéticamente forma otro clado, hermano a uno formado por *Plasmodium* y *Haemoproteus* (Perez-Tris *et al.*, 2005). Además estructuralmente en ninguno de sus estadios, *Leucocitozoon* presenta pigmentos maláricos (hemozoina), que sí están presentes en los otros dos géneros; por esto tradicionalmente no se considera a *Leucocitozoon* dentro de los parásitos causantes de la malaria (Valkiūnas *et al.*, 2005). Los parásitos en los géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium* infectan la sangre utilizando como vectores a insectos (Orden: Diptera) generalmente de los géneros *Culex*, *Aedes*, *Theoaldia* (Kudo, 1972) y *Anopheles* (Pérez-Tris *et al.*, 2005) o moscas hipobóscidas (Bennett y Pierce, 1988; Pérez-Tris *et al.*, 2005; Valkiūnas, 2005). Todas las especies de estos hemoparásitos son transmitidas por insectos hembras adultos, ya que los machos no se alimentan de sangre (Kudo, 1972).

Cuando las aves se infectan con malaria, su inmunidad, condición física y reproducción se ven afectadas causando, en algunos casos, la muerte (Atkinson *et al.*, 2008; Sol *et al.*, 2003). El ciclo de vida de estos parásitos se describe en detalle en Atkinson y van Riper,(1991), Kudo (1972) y Valkiūnas (2005). Generalmente, el vector, al alimentarse de la sangre, inocula esporocitos en el ave. Estos pasan por un desarrollo exoeritrocíticos entran a los eritrocitos llamándose equizontes. Los equizontes crecen y se multiplican formando merozoitos, los cuales son liberados en el torrente sanguíneo. La esquizogonía requiere cuarenta y ocho horas, y si los merozoitos liberados no son ingeridos por los leucocitos penetrarán a los eritrocitos y repetirán la esquizogonia. Luego de una esquizogonia repetida y

simultánea los eritrocitos infectados son destruidos liberando gran cantidad de toxinas en la sangre. Por otro lado, una cantidad de merozoitos se desarrollan formando macro y microgametocitos en lugar de sufrir esquizogonia y se mantienen en la sangre para que un nuevo vector lo ingiera. De esta manera, al ser ingeridos se desarrollarán en un oocinete (unión de 2 gametos), capaz de moverse, dentro del estómago del mosquito. Dentro de estos oocitos se desarrollan esporozoitos que cuando el oocito está completamente maduro se liberan en la hemolinfa. Una vez liberados se dirigen a las glándulas salivares, esperando a ser “liberados” dentro de la sangre de un hospedero (Figura 1; Atkinson y van Riper, 1991; Kudo, 1972; Valkiūnas, 2005).

Adicionalmente, los parásitos poseen un poro llamado citostoma el que les permite fagocitar el citoplasma del eritrocito hospedero (Aikawa *et al.*, 1986; Atkinson *et al.*, 2008), lo que provoca la muerte de la célula y el desarrollo de anemia (Atkinson *et al.*, 2008). Lo usual es que a mayor pérdida de glóbulos rojos, mayor producción de ellos (Mitchell y Johns, 2008). Esto se manifiesta con un mayor número de eritrocitos jóvenes (policromatófilos) presentes en la sangre. Además, el ave infectada sufre periódicas recaídas que están controladas por una compleja interacción entre respuesta inmune del ave enferma, estrés fisiológico y sistema endócrino, manteniéndose esta interacción por toda la vida (Jarvi *et al.*, 2002).

Los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* a pesar de pertenecer a diferentes familias (Plasmodiidae y Haemoproteidae) tienen un ciclo vital muy parecido (Figura 1); los gametocitos de ambos géneros poseen gránulos de pigmento (Atkinson *et al.*, 2008; Kudo, 1972). Sin embargo, los de *Plasmodium* tienen forma circular mientras que los de *Haemoptoreus* son elongados (Kudo, 1972). Estos gránulos de pigmento son la única diferencia observable por microscopía, por lo que es muy difícil diferenciar estos dos géneros

con certeza usando esta técnica. Otra diferencia entre *Plasmodium* y *Haemoproteus* es que *Plasmodium* tiene una reproducción asexual en la periferia de las células sanguíneas, mientras que *Haemoproteus* no (Ricklefs *et al.*, 2004). El género *Plasmodium*, en aves, es transmitido por mosquitos del género *Culex* (Atkinson y van Riper III, 1991; Ricklefs *et al.*, 2004) mientras que los parásitos del género *Haemoproteus* son transmitidos por los mosquitos y moscas de la familia Ceratopogonidae e Hippoboscidae (Valkiūnas, 2005).

La validez de varios taxa morfológicos es cuestionable pero Martinsen *et al.* (2006) mencionan, en base a una extensa revisión bibliográfica, que los principales caracteres diagnósticos para *Haemoproteus* son: forma y tamaño del gametocito, el tamaño del núcleo y su posición en la célula, el tamaño y el número de gránulos de pigmento, el tamaño y la forma de su célula huésped, la posición del gametocito en relación con el núcleo de la célula huésped, y el grado de desplazamiento del núcleo de la célula huésped. Para *Plasmodium* los mismos autores mencionan que es más difícil su identificación porque muchas descripciones bibliográficas carecen de mediciones, las características que se describen a menudo se basan en infecciones de huéspedes no naturales, experimentales y los caracteres diagnósticos incluyen rasgos de desarrollo exoeritrocíticos obtenidos en dichas infecciones experimentales.

Varios estudios han demostrado que especies con morfología similar son especies crípticas (e.g. Martinsen *et al.*, 2006). Para definir los géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium* y las especies dentro de estos se emplean caracteres morfológicos, principalmente la forma de los cristales de hemozoina, detalles del ciclo de vida, como el tiempo, y el rango de hospederos (Valkiūnas, 2005). Muchas especies pueden ser similares en uno o más de estos aspectos pero diferir en uno solo, por ejemplo Khan y Fallis (1970) mencionan que morfologías similares enmascaran importantes diferencias en el ciclo de vida entre las especies.

La virulencia de *Plasmodium*, al parecer, es más peligrosa para las aves, mientras que la de *Haemoproteus* es más prevalente en las poblaciones pero tiene efectos menores en la salud (Ricklefs *et al.*, 2004). Las infecciones de *Plasmodium* y *Haemoproteus* han sido reportadas alrededor del mundo, con excepción de la Antártica (Kudo, 1972; Valkiūnas, 2005). Cabe mencionar que la distribución de estos parásitos está relacionada con la distribución de sus vectores (Valkiūnas, 2005).

3.1.2. FACTORES FISIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS RELACIONADOS A LAS INFECCIONES DE MALARIA AVIAR

Existen varios estudios en los que se ha visto que la prevalencia de malaria aviar puede estar correlacionada a aspectos fisiológicos y ecológicos. Por ejemplo, Atkinson y van Riper (1991) sugieren que existe una correlación inversa entre masa corporal y prevalencia. De igual manera, el dimorfismo sexual está ligado a la malaria, así, especies con esta característica tienden a tener mayor prevalencia entre machos, por sus altos niveles de testosterona que inhiben la función inmunológica (Hamilton y Zuk 1982). En las especies sin dimorfismo sexual hay menor prevalencia, porque el nivel de testosterona no es tan elevado (Poulin y Forbes, 2012).

Entre los aspectos ecológicos relacionados a la infección de los huéspedes adultos, están la altura de forrajeo y su abundancia en la comunidad de aves. Con respecto a la altura de forrajeo se ha visto que a mayor altura de forrajeo hay mayor prevalencia, puesto que los mosquitos suelen estar mayormente en el dosel (Bennett y Fallis, 1960; Svensson-Coelho *et al.*, 2013); es decir cuando las aves forrajean en el piso tienen baja prevalencia de malaria aviar. En cuanto a la abundancia, a mayor abundancia mayor prevalencia (Anderson y May,

1979, 1981; Brown *et al.* 2001), ya que existen más individuos en los que se puede transmitir la enfermedad.

Finalmente, el comportamiento social que poseen las aves es una variable que está relacionada con la malaria, ya que especies no gregarias, es decir, en las que los individuos van solitarios o en parejas, tienden a presentar menor prevalencia (Valkiūnas, 2005), mientras que en especies en las que los individuos van de tres o más individuos (gregarias), hay mayor prevalencia porque existe mayor exposición a la enfermedad (Svensson-Coelho *et al.*, 2013); es decir, existe mayor cantidad de individuos que puedan transmitir la enfermedad a individuos con los que conviven.

3.1.3. MALARIA AVIAR EN EL NEOTROPICO Y EN EL ECUADOR

En el Neotrópico existen pocos estudios sobre parasitología y malaria aviar. Por ejemplo, Londoño *et al.* (2007) realizaron una comparación de prevalencia de malaria aviar entre el Neártico y el Neotrópico, basada en datos publicados inicialmente por Ricklefs (1992). Estos autores encontraron cuatro nuevos registros de hospederos de malaria aviar. Así mismo, Basto *et al.* (2006) hicieron un estudio de hematozoarios en la Serranía de la Macarena (centro de Colombia), en el cual reportaron una prevalencia de malaria aviar de 24% (69 especies analizadas). Existe también, un estudio de parásitos sanguíneos en Costa Rica por Young *et al.* (1993) en el que la infección fue más frecuente en tucanes (Ramphastidae) y pinzones (Emberizidae), generalmente en estación lluviosa y en estado de reproducción. Möens, (2010) menciona que en las últimas cinco décadas en toda América del Sur hay apenas alrededor de 30 publicaciones sobre infecciones de haematozoos con un sesgo de muestreo hacia las aves de bosques húmedos tropicales de bajuras.

En el Ecuador, hay pocos estudios sobre malaria aviar. A lo largo de los Andes ecuatorianos, un estudio, que recopiló datos obtenidos durante 1999–2004, encuentra un 31% de aves infectadas (428 individuos analizados) y una alta prevalencia en altas elevaciones (Harrigan *et al.*, 2014). Alrededor de Papallacta, Munro *et al.*, (2009) estudiaron los parásitos en adultos y pichones centrándose en épocas de incubación. En las zonas bajas de Morona-Santiago, Möens, (2010) encontró un 17.91% de prevalencia (335 individuos, 89 especies, 22 familias) y estudió la especificidad entre parásito y hospedero, encontrando linajes de haemosporidios generalistas y otros especialistas. En Galápagos, el estudio de Alarcón *et al.* (2008) solo se enfocó en dos especies endémicas el gavián y la paloma, y sugiere que la dinámica de poblaciones de los parásitos es independiente entre las islas. Finalmente, existe un estudio muy preliminar en las zonas montañas de Loja en el que se encuentra una relación positiva entre peso promedio de varias especies de colibríes y su prevalencia de infección por malaria aviar (Paca-Condori, 2012).

3.2 JUSTIFICACIÓN

El estudio de los protozoarios y otros parásitos está relacionado, habitualmente, con la medicina y su importancia económica. Sin embargo, los estudios e investigaciones en parásitos haemosporidios en especies silvestres son muy limitados (Basto *et al.*, 2006), especialmente aquellos en especies tropicales. La falta de conocimiento en las enfermedades infecciosas podría tener consecuencias inevitables para la conservación de las especies (Freed *et al.*, 2005), especialmente porque se ha visto un incremento de enfermedades infecciosas mientras que ha habido una disminución en el tamaño de las poblaciones e incremento de especies extintas (Freed, 1999; Harrigan *et al.*, 2014). Por ejemplo, en Hawaii, es conocido el

caso en el que, debido a la introducción de malaria aviar y viruela, empezó una alta tasa de declinación (hasta el momento 17 especies de las 41 conocidas) de los Mieleros (“Hawaiian honeycreepers”, subfamilia Drepanidinae) de estas islas (Atkinson y LaPointe, 2009). Adicionalmente, el estudio de enfermedades permite empezar a explorar cómo afectan estas en la regulación de la diversidad biológica, mediante procesos ecológicos, como la competencia intraespecífica e interespecífica y la depredación, ya que estas interacciones están presentes en todos los sistemas biológicos (Suzan *et al.*, 2000).

Además, el efecto de la malaria aviar en sus hospederos es poco conocido en el Ecuador (Harrigan *et al.*, 2014). Por lo tanto, son necesarias más investigaciones para comprender el comportamiento de la enfermedad, la susceptibilidad de las especies frente a ésta y las variables que podrían influenciar la susceptibilidad, de esta manera se podría entender mejor como la malaria afecta a las aves a nivel fisiológico en diferentes ecosistemas. Esta investigación se enfocó en el estudio de algunos aspectos básicos relacionados a la prevalencia de malaria aviar en el Bosque Protector Jerusalem, donde hay un ecosistema no estudiado antes para haematozoarios en el país. Además, es una zona con una diversidad de aves relativamente baja (75 especies; Cadena *et al.* com. pers.) con especies comunes y de amplia distribución, y escasos registros de aves migratorias (Lombeida, 2009; Trujillo y Trujillo, 2003). Por lo tanto, se trata de un sistema sencillo cuyo estudio permitiría comenzar a comprender las implicaciones que puede tener esta enfermedad a nivel de una comunidad. Adicionalmente, se ha visto en otros estudios (e.g., Jones *et al.*, 2013; Paca-Condori, 2012), que en áreas con altitud media—como es el caso del Bosque Protector Jerusalem—hay mayores tasas de prevalencia. Finalmente, es un lugar de fácil acceso lo que permite hacer un seguimiento más continuo y con mayor esfuerzo de muestreo que el que se podría hacer en zonas remotas (e.g., ubicadas en la Amazonía o Costa).

3.3 OBJETIVO GENERAL

Estudiar las infecciones de malaria en las aves comunes del Parque Recreacional-Bosque Protector Jerusalem y explorar las variables que determinan las diferencias de prevalencia e intensidad entre diferentes especies.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar cuál es la prevalencia de malaria aviar en las especies más comunes del Bosque Protector Jerusalem, utilizando diagnóstico molecular y microscópico.

2) Comparar ambas técnicas de diagnóstico (molecular y microscópico) a través de las diferencias en prevalencia obtenidas usando ambos métodos.

3) Analizar las diferencias de prevalencia entre especies aplicando un modelo lineal generalizado y explorar posibles causas de estas diferencias comparando los resultados con la bibliografía.

4) Analizar las diferencias de intensidad de infección entre individuos de cada especie aplicando una comparación no paramétrica entre especies.

5) Analizar las diferencias de intensidad de infección de los individuos de cada especie en relación a su condición física y a la producción de nuevos eritrocitos (policromatófilos), aplicando correlaciones entre estas variables.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El muestreo se realizó en El Parque de Recreación-Bosque Protector Jerusalem (Parque Jerusalem, Figura 2). Esta área protegida se encuentra entre los 2.000 y 2.400 m s.n.m. (00° 00' 05" N, 78° 21' 18" E), en el Valle del Río Guayllabamba, Provincia de Pichincha, en la vía Guayllabamba-Puéllaro, aproximadamente a 35 km al norte de Quito (Guerrón *et al.*, 2005). Su ecosistema está clasificado como “bosque y arbustal semideciduo del norte de los Valles” (MAE 2013). La zona tiene una estacionalidad marcada, seca en mayo–agosto (precipitación media de ~125 mm) y lluviosa en septiembre–abril (precipitación media de ~360 mm) (Carvajal-Campos, 2009). La temperatura tiene poca variación durante el año, con media anual de 19° C a la sombra (Carvajal-Campos, 2009). Todas estas variables se estimaron de datos colectados en el periodo 2000–2005 en las estaciones del INAMHI más cercanas al BPJ (La Victoria y Malchinguí; Carvajal-Campos, 2009).

4.2 CAPTURA Y PROCESAMIENTO

El muestreo de campo se realizó durante 6 meses, entre diciembre del 2012 y junio del 2013. Para capturar a las aves se colocaron siete redes de neblina (12 m × 2,5 m, de 25 mm de ojo de malla) en cuatro zonas diferentes del Parque. La ubicación de las zonas de muestreo se detalla a continuación: Zona 1—00° 00' 17,4" N, 78° 21' 34.7" O (2349 m s.n.m.), bajo la franja corta fuegos; Zona 2—00° 00' 08,8" N, 78° 21' 25.3" O (2294 m s.n.m.), dentro del vivero; Zona 3—00° 00' 21,4" N, 78° 21' 22,7" O, (2372 m s.n.m.), sobre la franja corta fuegos; Zona 4—00° 00' 08,8" N, 78° 21' 29,8" O, (2304 m s.n.m.), cerca de la carretera, en

el sendero turístico “Huellas del lobo” (Figura 3). Cada sitio fue visitado dos días, una vez al mes.

Las redes (Figura 4) se abrieron el primer día de 6h00 a 18h00 y el segundo día de 6h00 a 12h00, sumando un total de 36288 horas de muestreo (i.e., 12 m de red \times 7 redes \times 18 h por salida \times 4 salidas al mes \times 6 meses). Una vez capturadas, las aves fueron anilladas para poder identificarlas individualmente y evitar la réplica de datos con aves recapturadas (Anexo 1). Luego se tomaron datos de peso, edad (juvenil-adulto) y sexo (si la especie presentaba marcado dimorfismo sexual en plumaje), longitud de tarso, medidas del pico (largo, ancho, alto), y longitud del ala y de la cola (base de datos disponible en la Universidad Tecnológica Indoamérica, Figura 4).

Para el diagnóstico de malaria aviar, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular o branquial (Figura 4). El volumen de la muestra, entre 5 y 20 μ L (Möens, 2010), dependió del tamaño, y estrés del individuo al momento de la extracción. Una fracción de la muestra se utilizó para hacer un frotis, para diagnóstico de malaria por microscopía, el cual fue fijado en etanol absoluto por 3 minutos. La otra fracción se preservó en viales de 1,5 ml en alcohol al 96% para realizar análisis de diagnóstico molecular.

4.3. MICROSCOPIA Y CONTEO DE CÉLULAS

Para determinar el nivel de infección por malaria aviar (*Plasmodium* sp. o *Haemoproteus* sp.) los frotis sanguíneos fueron teñidos con solución GIEMSA al 10%, pH 7,2 por una hora (Anexo 2; Waldenström *et al.*, 2004, Möens, 2010). En un microscopio Olympus CX31 se prospectó todo el frotis a bajo aumento 40 \times , para determinar la presencia de

infecciones. Luego, bajo aumento de 100× (con aceite de inmersión) se contó: el número de células infectadas (Figura 5a), los policromatófilos (eritrocitos inmaduros, Figura 5b) y los eritrocitos sanos en 10.000 células por placa (Figura 5b, Ricklefs *et al.*, 2005; Waldenström *et al.*, 2004). Este procedimiento se aplicó en el caso de las especies que tuvieran más de 20 individuos muestreados (sin contar las aves recapturadas). Se utilizó el muestreo de al menos 20 individuos, porque este se ha relacionado con un error aproximado de 5% en la detección de estos parásitos (Jovani y Tella, 2006).

4.4 EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN de las muestras de sangre preservada en alcohol al 96%, se siguió un protocolo basado en lisis por tiocianato de guanidina y precipitación de ADN con isopropanol, y purificaciones con etanol (M. Fujita, no publicado) y acetato de sodio (Anexo 3). La cantidad de ADN de parásito (presencia-ausencia) se evaluó mediante electroforesis y tinción con SYBR® Safe (Invitrogen) en gel de agarosa al 1%. A partir de las extracciones madre se prepararon diluciones al 50% para ser usadas en las reacciones de Amplificación en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para el proceso de amplificación por PCR se utilizó la metodología de Cosgrove *et al.* (2008) (que combina la de Bensch *et al.*, 2000 y la de Waldenström *et al.*, 2004, Anexo 4) con ciertas modificaciones: para las muestras que dieron positivas desde el principio no se procedió a hacer PCR del producto del primer PCR (PCR anidado), mientras que aquellas que dieron negativas, o positivos no muy claros sí. Se amplificó un fragmento de 478 pb del gen de citocromo b mitocondrial de los parásitos haemosporidios. Se amplificó este gen mitocondrial debido a que, en los parásitos apicomplexos, tiene regiones conservadas que flanquean regiones variables del ADN, lo que lo hace apropiado para la detección e

identificación de distintos linajes de *Haemoproteus* y *Plasmodium* (Waldenström *et al.*, 2004). Los cebadores empleados fueron HaemF (5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3') y HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), exclusivos para la detección de *Haemoproteus* y *Plasmodium* (Waldenström *et al.*, 2004). Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa (1%) y tinción SYBR® Safe, buscando bandas de 500 pb (tamaño aproximado previsto para el amplificado). De tal forma se pudo observar si las muestras estaban infectadas con malaria aviar, y contrastar esa información con los datos del diagnóstico por microscopía. Para descartar posibilidades de contaminación se utilizó un control negativo (coctel de reacción sin ADN) en todas las reacciones. (Figura 6).

4.5. PREVALENCIA DE INFECCIONES DE MALARIA AVIAR

Se compararon las prevalencias (número de individuos infectados por especie para el número de individuos analizados durante los 6 meses de muestreo) obtenidas por diagnóstico molecular y por microscopía, por separado. Además, para obtener un resultado más real de la prevalencia y facilitar las comparaciones de prevalencias entre especies, en los casos en que se diagnosticaba la infección por microscopía y no por PCR, o *vice-versa*, se generó una nueva variable llamada “prevalencia máxima” (Valkiūnas *et al.*, 2008), cuyo valor era aquel de la máxima prevalencia registrada, ya fuera por microscopía o por PCR.

4.5.1. RELACIÓN DE LA PREVALENCIA CON FACTORES FISIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS

Para hacer comparaciones estadísticas de prevalencia de malaria entre especies, así como una posible relación entre peso y prevalencia, y entre abundancia y prevalencia, se utilizó el principio de Contraste Independiente (Felsenstein, 1985; Svensson-Coelho *et al.*,

2013). Esto se debe a que, por su historia filogenética común, ninguna especie de ave se puede considerar independiente de otra (i.e., los valores de sus variables en principio no son independientes, ya que podrían estar afectados por la filogenia; Felsenstein, 1985).

Para construir la filogenia se utilizaron secuencias del gen mitocondrial ND2, por ser aquel que estaba disponible para todas las especies analizadas (Anexo 5). Se concatenó una matriz de 1041 caracteres con 32 especies que incluían, tanto las especies analizadas, como una selección amplia de especies que representaban los órdenes y familias más representativos en la filogenia de las aves, con base en filogenias publicadas (Ericson *et al.*, 2006; Hackett *et al.*, 2008). Con estas secuencias se estimó un árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud en el programa GARLI 2.0 (Zwickl, 2006). El análisis fue conducido utilizando el modelo de sustitución nucleotídica GTR + I + G, indicado por JModeltest (Darriba *et al.*, 2012). Se realizaron 10 búsquedas independientes, de las cuales se escogió el árbol con la mayor verosimilitud. Para determinar el soporte del árbol se aplicó un análisis de bootstrap, utilizando una búsqueda y 100 pseudo-réplicas (Figura 7).

Luego de asegurar la robustez del árbol, se procedió a escindir (cortar) las ramas conducentes a las especies que no se iban a analizar, para que solo permanecieran en el árbol las especies de interés (Figura 8). Todo el procedimiento, desde la inclusión de especies de diversas ramas del árbol de las aves, la estimación árbol y la eliminación de especies que no eran de interés, busca obtener el árbol filogenético que mejor estime las relaciones entre las especies y sus largos de rama, permitiendo retener solo las especies de interés sin que estos dos parámetros (topología y longitud de ramas) se alteren (Vargas *et al.*, 2012).

Una vez obtenida la filogenia para las nueve especies de interés, el análisis de Contraste Independiente se realizó en el programa Mesquite ver. 2.75 para Macintosh (Madison y Madison, 2007), utilizando el módulo PDAP ver 1.07 (Midford *et al.*, 2005). Para

los análisis de la relación de prevalencia, peso y abundancia con la estructura filogenética, se utilizaron la prevalencia máxima, el promedio de peso de todos los individuos y la abundancia absoluta de cada especie (es decir, el número total de individuos de cada especie registrado durante todo el estudio). Si bien este último dato podría estar sesgado por el muestreo mediante redes de neblina, las abundancias observadas mediante este procedimiento son coherentes con las abundancias relativas obtenidas mediante observación durante el mismo periodo (Cadena *et al.* com. pers.). Finalmente, con los datos de prevalencia, peso y abundancia, se siguió el siguiente procedimiento: 1) se obtuvieron los contrastes independientes de cada variable; 2) se hicieron correlaciones de Pearson entre “la raíz cuadrada de la suma de los largos de rama” (tomados de la filogenia) y los “valores absolutos del contraste estandarizado” de las variables prevalencia, peso y abundancia, respectivamente.

Para determinar la posible influencia de otras variables de historia natural en la prevalencia, se realizó una búsqueda bibliográfica en la que se determinaron las siguientes variables para las especies más abundantes: altura de forrajeo, dimorfismo sexual y gregarismo (Anexo 6). Para la altura de forrajeo se tomó en cuenta si las especies forrajeaban estrictamente en el piso, del piso a estratos medios y de estrato medio a dosel o de piso a dosel (Bennett y Fallis, 1960; Svensson-Coelho *et al.*, 2013). Para el gregarismo se consideró a una especie gregaria cuando forma grupos de tres individuos en adelante (Svensson-Coelho *et al.*, 2013); esta variable se categorizó como gregario/no gregario, y lo mismo se hizo con dimorfismo (dimorfismo/no dimorfismo).

Con estos datos se aplicó una regresión múltiple en STATISTICA (StatSoft, 2007), utilizando un modelo lineal generalizado en el que la variable respuesta (variable dependiente) era prevalencia, las covariables eran peso y abundancia, y los factores (variables independientes) eran las variables categóricas de historia natural (altura de forrajeo,

dimorfismo sexual y gregarismo). Por el reducido número de especies y los pocos grados de libertad de las comparaciones, se realizó un proceso en el que se probaron diferentes modelos en los que solo se incluía un factor a la vez y luego todas las combinaciones de dos de los tres factores analizados. El mejor modelo sería aquel con el mayor valor de verosimilitud.

4.6 INTENSIDAD DE INFECCIONES DE MALARIA AVIAR

La intensidad de infección es el número de células infectadas de un total de células analizadas (Möens, 2010). Siguiendo las recomendaciones de Merino *et al.* (1997) y de Waldenström *et al.* (2004), en este trabajo, la intensidad de infección fue tomada como el número de células infectadas por cada 10.000 células analizadas (Anexo 7). Para determinar las diferencias de intensidad de infección entre especies, primero se puso a prueba si la filogenia tenía algún efecto sobre la variable intensidad, es decir, que dos especies tuvieran intensidades similares solo por el hecho de estar más relacionadas filogenéticamente. Para ello se aplicó el método de contraste independiente, siguiendo un procedimiento similar al aplicado a los datos de peso, prevalencia y abundancia, tomando en cuenta los datos de intensidad de infección de cada individuo, de cada especie.

Con los datos de intensidad de cada especie se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para probar la normalidad de los datos. Como los datos no fueron normales, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis para ver diferencias de intensidad entre especies, seguida de una comparación múltiple pareada de las diferencias en intensidad entre especies. Todos los análisis de intensidad se realizaron STATISTICA (StatSoft, 2007).

4.6.1. RELACIÓN DE LA INTENSIDAD CON FACTORES FISIOLÓGICOS

Para explorar si existe una relación entre la condición física y la intensidad de las infecciones en las especies más afectadas, se calculó la condición física dividiendo el peso para el largo del pico (Chastel *et al.*, 1995) y también sacando una proporción entre peso y la suma del tamaño del pico y el tarso (Kitaysky *et al.*, 1999). Luego se realizaron correlaciones de Pearson entre condición física e intensidad de infección para cada especie por separado, únicamente con las especies en que el número de células infectadas difería de cero excluyendo también a *Sporagra magellanica*, ya que ésta presentaba tan solo tres individuos con una sola célula infectada. Finalmente, para explorar si existía una relación entre la intensidad de infección y el número de policromatófilos, también se realizaron correlaciones de Pearson entre número de policromatófilos y número de células infectadas para cada especie por separado, en las especies más afectadas.

5. RESULTADOS

Las especies más abundantes (especies que tuvieron más de 20 individuos muestreados, sin contar recapturas) resultaron ser nueve. Estas fueron: una paloma (*Columbina passerina*; familia Columbidae, orden Columbiformes), dos colibríes (*Colibrí coruscans* y *Myrtis fanny*; familia Trochilidae, orden Apodiformes), un atrapamoscas (*Pyrocephalus rubinus*, familia Tyrannidae, orden Passeriformes), un soterrey (*Troglodytes aedon*, familia Troglodytidae), un jilguero (*Sporagra magellanica* [antes *Carduelis magellanica*], familia Fringillidae, orden Passeriformes), dos tangaras (*Phrygilus plebejus* y *Catamenia analis*, familia Thraupidae, orden Passeriformes) y un gorrión (*Zonotrichia capensis*, familia emberizidae, orden Passeriformes; Figura 9; Anexo 1).

5.1. PREVALENCIA DE INFECCIONES DE MALARIA AVIAR

En la Tabla 1, se presentan los resultados de prevalencia de malaria aviar para las nueve especies más comunes (con más de 20 muestras) del Bosque Protector Jerusalem. Los resultados fueron obtenidos en base a 20 individuos de cada especie, cuyas muestras fueron utilizadas tanto para obtener los frotis sanguíneos (diagnóstico por microscopía), como para la obtención de sangre preservada en alcohol (diagnóstico molecular). De las especies estudiadas, el ave con mayor prevalencia por microscopía fue *Columbina passerina* con 100% de prevalencia (i.e., con todos los individuos infectados), seguida de *Phrygilus plebejus* con 90%, *Zonotrichia capensis* con 80%, *Catamenia analis* con 60%, y *Sporagra magellanica* con 15%. Los dos colibríes, *Colibrí coruscans* y *Myrtis fanny*, junto con *Pyrocephalus rubinus* y *Troglodytes aedon* mostraron 0% de prevalencia.

Sin embargo, los resultados de prevalencia por diagnóstico molecular vía PCR arrojaron datos algo distintos. El ave con mayor prevalencia siguió siendo *Columbina passerina* pero con 80%, seguida de *Zonotrichia capensis* con 75%, *Phrygilus plebejus* con 65%, *Catamenia analis* con 35% y *Sporagra magellanica* con 5%. A diferencia de los datos de microscopía, *Colibrí coruscans* y *Pyrocephalus rubinus* presentaron un 5%, mientras que para *Myrtis fanny* y *Troglodytes aedon* se confirmó una prevalencia de 0%.

5.1.1 RELACIÓN DE LA PREVALENCIA CON FACTORES FISIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS

En los análisis de la relación de prevalencia, peso corporal y abundancia con la estructura filogenética, el coeficiente de correlación de Pearson indicó que no existe una relación estadística significativa entre la estructura filogenética y cualquiera de las tres variables: prevalencia ($r^2 = 0,007$; $p = 0,90$; Figura 10a), peso ($r^2 = 0,003$; $p = 0,85$; Figura 10b) y abundancia ($r^2 = 0,262$; $p = 0,04$; Figura 10c). Con base en estos resultados, se utilizaron las tres variables no corregidas por la filogenia en el cálculo de la regresión múltiple (modelo lineal generalizado). El modelo con mayor verosimilitud ($-\log \text{likelihood} = -14,43$) fue aquel que incorporó, además de prevalencia (variable dependiente o respuesta), las variables predictoras abundancia y peso (covariables), y altura de forrajeo y gregarismo (variables independientes o factores). Este análisis mostró una relación significativa de todas las variables ($p > 0,01$) predictoras con la prevalencia, a excepción del factor de interacción entre altura de forrajeo y gregarismo. Los resultados sugieren que: 1) a mayor peso, mayor prevalencia; 2) a mayor abundancia, mayor prevalencia; 3) a menor altura de forrajeo, mayor

prevalencia y 4) las especies gregarias tienen mayor prevalencia que las no gregarias.

5.2. INTENSIDAD DE INFECCIONES DE MALARIA AVIAR

Para el análisis de intensidad, se analizaron 20 placas por especie (10.000 células por placa) de las mismas nueve especies e individuos analizados anteriormente, para un total de 200.000 células contadas, por especie. Entre las especies infectadas, *Sporagra magellanica* mostró solamente tres individuos infectados con tan solo una célula cada uno. Los 20 individuos de *Columbina passerina* estuvieron infectados con un rango de 5–635 células infectadas, *Phrygilus plebejus* tuvo un rango de 0–301 células infectadas, *Zonotrichia capensis* tuvo un rango de 0–198 y *Catamenia analis* un rango de 0–508 células infectadas (Tabla 1).

En los análisis de la relación de la intensidad de infección con la estructura filogenética, el coeficiente de correlación de Pearson indicó que no existe una relación estadística significativa entre la estructura filogenética y la intensidad de infección ($r^2 = 0,026$; $p = 0,28$). Con base en estos resultados, se utilizó la intensidad de infección no corregida por la filogenia en las comparaciones entre especies.

El análisis de Kruskal-Wallis encontró una diferencia significativa de intensidad de infección entre todas las especies, en general ($H [8, n = 180] = 131,20$; $p < 0,000$). En la Tabla 2 se presenta la comparación múltiple, donde se muestran las diferencias de intensidad (significativas o no) entre especies. De estos resultados y de la Figura 11, se deduce que *Sporagra magellanica*, *Colibri coruscans*, *Myrtis fanny*, *Pyrocephalus rubinus* y *Troglodytes aedon* muestran intensidades de infección estadísticamente menores a *Phrygilus plebejus*,

Zonotrichia capensis y *Columbina passerina*, mientras *Catamenia analis* no se diferencia de ninguna especie, por la gran variación de intensidad de infección (0–508, Figura 11) entre los individuos analizados.

Ninguna de las correlaciones de Pearson entre la intensidad y la condición física por especie dio resultados estadísticamente significativos (*Catamenia analis* $r^2 = 0,176$, $p = 0,066$, Figura 12a; *Phrygilus plebejus* $r^2 = 0,023$, $p = 0,525$, Figura 12b; *Zonotrichia capensis* $r^2 = 0,010$, $p = 0,673$, Figura 12c; *Columbina passerina* $r^2 = 0,002$, $p = 0,834$, Figura 12d). Los resultados indican que, para los datos analizados, la condición física no está correlacionada con la intensidad de infección.

Finalmente, los resultados de las correlaciones de Pearson entre la intensidad y el número de policromatófilos de las especies infectadas, tampoco mostraron una relación significativa entre estas variables (*Catamenia analis* $r^2 = 0,507$, $p = 0$, Figura 13a; *Phrygilus plebejus* $r^2 = 0,024$, $p = 0,516$, Figura 13b; *Zonotrichia capensis* $r^2 = 0,036$, $p = 0,42$, Figura 13c; *Columbina passerina* $r^2 = 0,060$, $p = 0,298$, Figura 13d). Es decir, en este caso, no se observó una correlación entre intensidad de infección y número de policromatófilos.

6. DISCUSIÓN

6.1. PREVALENCIA DE MALARIA AVIAR EN EL BOSQUE PROTECTOR

JERUSALEM

Las infecciones de macro y micro parásitos son reconocidas entre las más importantes selecciones de presión en aves (Astudillo *et al.*, 2013), por lo que la presencia o ausencia de estas permiten entender en qué estado se encuentra una comunidad. Así, el presente estudio de prevalencia de malaria aviar contribuye a comprender cuál es el rol de esta enfermedad en la comunidad de bosque seco del Bosque Protector Jerusalem. Pese a haber un estudio detallado de entomofauna en esta mismo bosque (Subía, 2014), no se reporta la presencia de ninguno de los vectores de malaria aviar. Probablemente, esto se debe a que para detectar a estos vectores se necesitan metodologías más específicas y protocolos de identificación taxonómica muy detallados (Subía, 2014). Sin embargo, los resultados de este estudio sugieren la presencia de alguno de los vectores de malaria aviar, ya que existe una prevalencia alta total de esta infección en la comunidad de aves del BPJ. Esta prevalencia total del 40,5% (n = 180; 9 especies analizadas) está entre las más altas registradas hasta la fecha en Ecuador, combinando datos de adultos e inmaduros. Munro *et al.* (2009), en un estudio en las zonas altas de los Andes del Ecuador (59 individuos analizados de diversas especies, incluyendo *Zonotrichia capensis* y *Sporagra magellanica*), encontraron una prevalencia de al menos 39% de individuos adultos infectados y 44% de pichones infectados.

A nivel del Neotrópico, la prevalencia encontrada en este estudio también es un prevalencia bastante alta. Möens (2010) presenta un listado de 23 estudios en varios países del Neotrópico, incluidos sus datos de Ecuador, en los que el promedio de las prevalencias de

Plasmodium y *Haemoproteus* en todos los estudios es 9,6%, siendo Guyana (27,6%; n = 195) el país con más alta prevalencia (ver Durrant *et al.* 2006). A continuación se discuten algunos aspectos importantes relacionados a la prevalencia, como lo son las diferencias entre las metodologías de diagnóstico, el efecto de la filogenia y las diferencias entre especies.

6.1.1 DIFERENCIAS EN LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Durante este estudio se observaron diferencias en la capacidad de diagnóstico de las técnicas de microscopía y PCR. Por ejemplo, se encontró que *Sporagra magellanica* tuvo 15% de prevalencia por microscopía y por PCR tuvo 0%. Este resultado se dio porque tres individuos en los que la infección no fue detectada vía PCR, en realidad tenían infecciones leves en las que se detectó una célula infectada en el conteo de 10.000 células. Contrariamente *Colibri coruscans*, *Pyrocephalus rubinus* y *Troglodytes aedon* tuvieron prevalencias positivas en PCR (5%, 5% y 15% respectivamente) mientras que en microscopía tuvieron prevalencia nula (0%), es decir, no se detectó ninguna célula infectada. Finalmente, para el resto de especies es decir *Catamenia analis*, *Phrygilus plebejus*, *Zonotrichia capensis*, y *Columbina passerina* las prevalencias por microscopía (60%, 90%, 80% y 100% respectivamente) fueron más altas que las de PCR (35%, 65%, 75% y 80% respectivamente) a excepción de *Myrtis fanny* que tuvo 0% en ambos métodos de diagnóstico.

Es importante señalar que, a bajos niveles de infección, tanto la microscopía como el diagnóstico molecular por si solos, pueden no ser concluyentes. En el caso del diagnóstico molecular, es posible que haya tan pocas células infectadas, que la concentración de ADN sea muy baja para ser detectada vía PCR (Jarvi *et al.*, 2002). En el caso de este estudio, no se

detectaron infecciones cuando hubo menos de 10 células infectadas en 10,000 células analizadas. Por otro lado, se observó que en 18 individuos, de los 180, la infección tampoco fue detectada por PCR, siendo que por morfología tenían un rango de 16 a 508 células infectadas. Estos falsos positivos pueden darse por ser fallas en el procedimiento del PCR o porque las muestras de sangre eran muy pequeñas para contener suficiente ADN de parásito. También es posible que las diluciones al 50% hayan disminuido la cantidad de ADN de parásito presente en la muestra, sin embargo, esta dilución se aplicó porque las muestras sin diluciones resultaron en PCRs negativos. La dilución se aplicó para diluir la concentración de posibles inhibidores de la PCR y así aumentar las posibilidades de amplificación, siguiendo a Wilson (1997).

Jarvi *et al.* (2002) detectan hasta 1 célula infectada en 50.000 eritrocitos por microscopía, pero en estas mismas muestras detectan hasta tres veces más positivos con técnicas moleculares (en 103 muestras por microscopía obtienen 28 positivos y por PCR 87), lo que evidencia que las técnicas moleculares sí son más sensibles que la microscopía. Sin embargo, su eficiencia también está relacionada con factores metodológicos, como la calidad y cantidad de las muestras y del ADN extraído.

Mientras que en la microscopía es poco probable que resulte en falsos positivos, en PCR a gran escala es una preocupación importante (Valkiūnas *et al.*, 2008). Los análisis en los que se ha visto menos sensibilidad en microscopía en comparación a PCR, se dan probablemente por deficiencias en la aplicación de esta metodología (Valkiūnas *et al.*, 2008). Es probable que gracias al pronto tratamiento de las placas de este análisis se obtuvieron mejores resultados que la técnica del PCR, ya que, para una buen análisis de microscopía, las placas deben ser frescas (Valkiūnas *et al.*, 2008).

El PCR también ha sido criticado por no ser sensible a los fenómenos de co-infección, es decir, que solo aplicando PCR no se podría detectar a todos los parásitos que podrían estar infectando a una muestra (Loiseau *et al.*, 2010), por lo tanto las co-infecciones pueden ser subestimadas (Valkiūnas *et al.*, 2006) de tal manera que, en el PCR, solamente se amplifica el parásito más fuerte para la muestra. Sin embargo, en este caso, la inhibición de uno de los parásitos no sería un problema, pues se detectaría el ADN de al menos un parásito (el más fuerte) y la muestra resultaría positiva en el gel de PCR. Es por eso que es improbable que las co-infecciones estén generando falsos positivos.

Tradicionalmente, la metodología estándar para diagnosticar infecciones por parásitos de malaria aviar consiste en el análisis por microscopía de placas teñidas con GIEMSA (Waldenström *et al.*, 2004). Esta técnica permite observar el microgametocito, que tiene un halo alrededor del núcleo de la célula del ave (Valkiūnas, 2005). Sin embargo, a bajas intensidades de infección o en infecciones tempranas, es posible que, aunque haya algunas células infectadas, estas no sean detectadas por la baja probabilidad de encontrarlas durante los conteos (Astudillo *et al.*, 2013; Jovani y Tella, 2006). Tanto es así, que en este trabajo hubo diez casos en los que la infección fue detectada por PCR, mas no por microscopía.

Es importante señalar que, las imprecisiones en los diagnósticos molecular y de microscopía se pueden solucionar usando serología, técnica que detecta los anticuerpos desarrollados a un conjunto común de antígenos de la malaria, y puede detectar parásitos circulantes en aves con baja intensidad de infección (Atkinson *et al.*, 2001). Sin embargo, esta técnica requiere protocolos más complejos, tanto de obtención de muestras en el campo (e.g., centrifugación de plasma *in situ*) y reactivos especializados para el diagnóstico, como un conocimiento previo de los rasgos de la infección (Atkinson *et al.*, 2001; Jarvi *et al.*, 2002).

Otra técnica que puede solucionar estas imprecisiones es el PCR a tiempo real (q PCR), ya que esta técnica permite obtener resultados de presencia o ausencia de infección y el número de células infectadas que presenta la muestra (Bentz *et al.*, 2006; Knowles *et al.*, 2011). No obstante, los costos y el equipo para aplicar esta técnica son considerables y exceden las posibilidades de esta investigación.

Por estas razones, la combinación de microscopía y PCR sigue siendo una opción práctica para este tipo de estudios. Esta combinación saca provecho de ambos métodos, con la ventaja adicional de que la microscopía muestra la intensidad de la infección parasitaria (Waldenström *et al.*, 2004) como el número de células infectadas en función del número de células sanas y permite conservar las muestras para la posterior identificación morfológica de los parásitos. Por su parte, el diagnóstico molecular permite que se continúe el proceso hasta la identificación molecular de los linajes de parásitos. Es decir, ambas técnicas contribuyen a un análisis posterior más profundo de la biología de los parásitos.

6.1.2. DIFERENCIAS DE PREVALENCIA ENTRE ESPECIES: EL FACTOR FILOGENÉTICO

Las especies con mayor prevalencia de malaria aviar fueron *Columbina passerina* (Columbidae, 100%), *Phrygilus plebejus* (Thraupidae, 90%), *Catamenia analis* (Thraupidae, 60%) y *Zonotrichia capensis* (Emberizidae, 80%); además se obtuvo una prevalencia baja pero no nula (15%) en *Sporagra magellanica* (Fringillidae). Estos resultados coinciden con los de Bennett y Souza-Lopes (1980), que encontraron prevalencias relativamente más altas en Columbidae (20%), Fringillidae (15,9%) y Thraupidae (10,4%).

Es posible que las aves de las familias Columbidae, Fringillidae y Thraupidae sean genéticamente más susceptibles a la infección de parásitos sanguíneos (Bennett y Souza-López, 1980) o tengan rasgos ecológicos o fisiológicos que los hacen más susceptibles a la infección. Basto *et al.* (2006) encontraron que las familias de aves de origen Neártico (e.g., Columbidae), tienen mayor prevalencia que las del Neotrópico (e.g., Trochillidae, Tyrannidae). No obstante, el patrón de transmisión para la mayoría de hemoparásitos aviares y la susceptibilidad del huésped son aún desconocidas en la región Neotropical especialmente para aquellas aves que tienen origen tropical (Rodríguez *et al.* 2009). La prevalencia del *Pyroccephalus rubinus* fue baja (5%). En otros estudios se ha visto que otros representantes pertenecientes a la misma familia (Tyrannidae), de origen Neotropical, tampoco tienen prevalencias altas (Matta *et al.*, 2004; Rodríguez y Matta, 2001; Rodríguez *et al.*, 2009), lo que refuerza la hipótesis de Basto *et al.* (2006).

Por el contrario, el estudio de Svensson-Coelho *et al.* (2013) en la Amazonía ecuatoriana, no encontró infecciones en Columbidae, sugiriendo que pueden existir diferencias en la prevalencia en función tanto de distintos hábitats o regiones biogeográficas (no necesariamente del origen de las familias) como de distribución, abundancia y ecología de vectores (Atkinson *et al.*, 2008; Valkiūnas, 2005). Matta *et al.* (2004) también sugieren que algunos aspectos en la fisiología o en la genética de las aves (especialmente en Tyrannidae) podría estar reduciendo la prevalencia de haemoparásitos. No obstante, para una visión más completa de estos fenómenos hacen falta estudios más profundos en diferentes tipos de comunidades de aves de orígenes biogeográficos y evolutivos diferentes, y que viven en distintos hábitats.

Pese a que en este estudio no se encontró una relación significativa entre prevalencia y estructura filogenética, es posible que esta relación si exista, pero no haya sido detectada por limitaciones de muestreo. Por ejemplo, posiblemente el número de especies de distintos orígenes evolutivos y dentro de cada linaje, no fuera suficiente como para detectar estas posibles diferencias. Esta limitación podría superarse haciendo un muestreo a largo plazo en la zona de estudio, permitiendo analizar especies adicionales que no fueron suficientemente abundantes en el presente muestreo.

6.1.3. RELACIÓN DE LA PREVALENCIA CON FACTORES FISIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS

La prevalencia de malaria aviar no es igual en todas las especies. De hecho, como ya se ha señalado, diversos estudios han asociado esta variación a diferencias de origen evolutivo, historia natural, biogeografía, abundancia de vectores, entre otros (e.g.: Atkinson *et al.*, 2008; Bennett y Fallis, 1960; Marzal *et al.*, 2008; Svensson-Coelho *et al.*, 2013; Valkiūnas, 2005). En este estudio se encontró que la prevalencia en el Bosque Protector Jerusalem está relacionada con el peso o masa corporal, y con aspectos de historia natural, tales como abundancia en la población, altura de forrajeo, y comportamiento social.

Los resultados muestran que, a mayor masa corporal, aumenta la prevalencia (Figura 14). La relación entre estas dos variables se puede explicar porque mientras más grande es el cuerpo, los vectores poseen más área para picar (Svensson-Coelho *et al.*, 2013) por lo tanto estos encuentran más superficie para alimentarse en un ave grande. Un estudio similar en colibríes (Paca-Condori, 2012) también encontró que a mayor masa corporal, mayor prevalencia. También, es posible que animales de cuerpos más grandes puedan resistir mejor

la infección que animales más pequeños (Ashford *et al.*, 1991). Sin embargo, estos resultados son contrarios a los reportados en Atkinson y Van Riper III (1991) que mencionan la existencia de estudios en los que se ve una ligera correlación negativa entre la masa corporal y la infección, mientras que Bennett *et al.* (1988) no encuentran ninguna relación entre el peso y la prevalencia.

Es interesante que las aves de menor peso sean los dos quindes, que a la vez tienen baja prevalencia. Este resultado podría estar relacionado a su bajo peso, pero también a que los mosquitos no puedan picarles tan fácilmente como a otras aves. Posiblemente su vuelo constante (*hovering flight*; Schuchmann, 1999) dificulte que los mosquitos puedan alimentarse de ellos, reduciendo las probabilidades de picaduras solamente a los momentos cuando están perchados. Esta relación entre tamaño y movilidad en los quindes, podría sesgar los resultados de la relación encontrada entre peso y prevalencia.

Por otro lado, la prevalencia aumentó conforme aumenta la abundancia de cada especie en la comunidad. Esto se debe a que mientras más densa es la población, mayor es la transmisión debido a que hay más abundancia de hospederos (Svensson-Coelho *et al.*, 2013). Por esta razón, en poblaciones densas existen altas tasas de transmisión de parásitos de malaria (Ricklefs *et al.*, 2005). Además, para que la enfermedad con un umbral mínimo de infección persista en la población, es necesario que la población sea abundante (Ricklefs *et al.*, 2005).

La baja prevalencia en algunas especies poco abundantes podría estar sesgada por que posean un linaje de parásito de malaria más virulento. Se sabe que en Bosque Protector Jerusalem hay al menos hay 4 linajes de *Plasmodium* (ejemplo de secuencia, Anexo 8, Cadena, com. pers., tesis en curso) y 2 de *Haemoproteus* (ejemplo de secuencia Anexo 8,

Cadena, com. pers., tesis en curso) en una sola especie hospedera (*Zonotrichia capensis*). Un linaje especialmente virulento podría provocar más muertes de individuos, dando como resultado bajas prevalencias al momento de capturarlos con las redes (Basto *et al.*, 2006). Sin embargo, es prácticamente imposible comprobar esta relación con estudios de campo, ya que en la vida silvestre es difícil encontrar las aves que han muerto o estén moribundas; para ello habría que conducir estudios de laboratorio, en condiciones controladas de infección y evolución de la misma.

Se esperaba que el dimorfismo sexual tuviera una relación significativa con la prevalencia, ya que especies con esta característica tienden a tener mayor prevalencia entre machos, por sus altos niveles de testosterona que inhiben la función inmunológica (Hamilton y Zuk, 1982). Sin embargo, los resultados sugieren que no existe tal relación en este caso. En otro estudio se encontró que el aumento de infección se da a nivel de la época de reproducción (Astudillo *et al.*, 2013) mas no a nivel de dimorfismo sexual. En ese estudio, las diferencias de prevalencias a nivel sexual, están dadas por el esfuerzo del ave en épocas de reproducción (aquellos que están destinados a la reproducción), más no por selección sexual (Atkinson *et al.*, 2008; Astudillo *et al.*, 2013). Adicionalmente, Ricklefs *et al.* (2005) tampoco encontraron relación entre dimorfismo sexual y prevalencia. Ellos explican que la prevalencia es más cambiante que los rasgos de historia natural y sugieren que el dimorfismo sexual no tiene relación estrecha con la prevalencia.

También se encontró que las especies con más prevalencia son aquellas que se desenvuelven en estratos bajos del bosque. Estos resultados son intrigantes si se considera que los vectores son generalmente más abundantes en el dosel (Svensson-Coelho *et al.*, 2013). Sin embargo, Svensson-Coelho *et al.* (2013) proponen que la estratificación vertical de

abundancia varía entre las especies de dípteros hematófagos y puede ser que en ciertos sitios son más abundantes en el suelo y en otros no. Para poner a prueba esta hipótesis, habría que hacer un estudio adicional en el que se analicen simultáneamente los hospederos y los vectores de malaria en el BPJ. Además, la relación entre prevalencia y altura de forrajeo, tanto en familias como en especies hospederas, podría existir no solo por una mayor abundancia de vectores, sino por otras variables ocultas relacionadas a la ecología, comportamiento de las aves (Bennett y de Souza-Lopes, 1980) y/o al linaje de los parásitos (Astudillo *et al.*, 2013; Basto *et al.*, 2006; Ricklefs *et al.*, 2004). Para corroborar esta información se recomienda medir variables adicionales del comportamiento y la ecología de las aves, así como usar secuenciación para diferenciar entre *Plasmodium* y *Haemoproteus*.

Finalmente, los resultados también mostraron que las especies gregarias tienen mayor prevalencia que las no gregarias. Al igual que con la abundancia, estas tienen mayor cercanía con individuos infectados (Svensson-Coelho *et al.*, 2013), aumentando la probabilidad de transmisión. Las especies que tienen menores prevalencias son aquellas que van solitarios o en parejas, ya que tienen menos probabilidad de contacto con la infección y con parásitos infectados (Valkiūnas, 2005). Aunque el gregarismo, provee protección y ciertas ventajas ecológicas a las aves, puede conllevar un costo alto, que al igual que en el estudio de González *et al.* (2014), implica mayor prevalencia de infección ya que existe mayor exposición a la enfermedad (Svensson-Coelho *et al.*, 2013); es decir, existe mayor exposición de los individuos a la infección al andar con otros que pueden estar infectados.

6.2. INTENSIDAD DE INFECCIONES DE MALARIA AVIAR

6.2.1. DIFERENCIAS DE INTENSIDAD DE INFECCIÓN ENTRE ESPECIES

De todas las aves infectadas, los resultados son consistentes con las fases de infección reportadas por Valkiūnas (2005). Se encontraron 61 individuos, de todas las especies infectadas (*Sporagra magellanica*, *Catamenia analis*, *Phrygilus plebejus*, *Zonotrichia capensis*, *Columbina passerina*) en épocas de decaimiento de infección (menos de 200 células infectadas en 10000; Valkiūnas, 2005), cuatro en épocas altas de infección (de 200 a 300 células infectadas; Valkiūnas, 2005), dos en épocas de máxima infección (de 300 a 400; Valkiūnas, 2005), y dos sobre los valores de máxima infección (más de 400 células infectadas; Valkiūnas, 2005). Sin embargo, para saber, con certeza, la fase de infección en la que se encuentra un ave es necesario conocer más sobre la historia de infección con estudios a largo plazo.

Cabe destacar que, en los resultados obtenidos en el presente estudio, las especies que tuvieron mayor intensidad de infección (*Columbina passerina*, *Phrygilus plebejus*, *Zonotrichia capensis*, *Catamenia analis*) fueron también las que tuvieron mayor prevalencia (100%, 90%, 80%, 60% respectivamente). En Ventim *et al.* (2012) de todas las especies analizadas la segunda (*Acrocephalus arundinaceus*) y tercera (*Acrocephalus scirpaceus*) con mayor intensidad de infección también mostraron prevalencias entre las más altas (57.6% y 33.1%, respectivamente); sin embargo la especie con mayor prevalencia (58.8%) tuvo intensidad baja. Hauptmanová *et al.* (2006) encontraron la más alta intensidad en la segunda especie (de 33) con menos prevalencia. En vista de la heterogeneidad de estos datos, se puede sugerir que no hay correlación entre estas dos variables; es posible que sean otros factores los

que influyen tanto en la intensidad como en la prevalencia. Es importante determinar los linajes específicos de los parásitos que están infectando a estas especies, para determinar cuáles linajes alcanzan mayores prevalencias o producen mayores intensidades de infección. También sería importante determinar si las especies o familias de aves comparten uno o varios linajes de haemoparasitos. De esta manera, se podría confirmar si es que las especies con altas intensidades han evolucionado con el parásito y por eso siguen siendo abundantes (Hellgren *et al.*, 2009).

6.2.2. RELACIÓN DE LA INTENSIDAD CON FACTORES FISIOLÓGICOS

Los parásitos sanguíneos pueden tener efectos perjudiciales en el peso del ave y su condición física, reduciendo su supervivencia y su respuesta inmune (Marzal *et al.*, 2008), y permitiendo un aumento en la intensidad de infección (i.e., números de eritrocitos infectados en relación a eritrocitos sanos). Sin embargo, los resultados obtenidos no apoyan una correlación negativa entre intensidad de infección y condición física. Esto podría deberse a que el tamaño de muestra fue muy reducido como para observar estos efectos o que existen otras variables involucradas que deberían estudiarse para entender mejor esta relación. Otra posibilidad es que los resultados no evidencien esta relación, si es que las aves que tuvieron mayor intensidad de infección y baja condición física se vieron altamente perjudicadas, y no pudieron ser capturadas.

Al igual que en Astudillo *et al.* (2013), no se encontró una relación significativa entre nivel de infección y policromasia, que es el número elevado de policromatófilos (eritrocitos maduros). Ellos también encontraron que la policromasia fue significativamente mayor en la

época de reproducción que en la época de no reproducción. Así, para estudios futuros, sería importante tomar en cuenta la variable “época de reproducción” al estudiar la policromasia. Un alto número de policromatófilos también se encuentra en aves sanas (Gálvez *et al.*, 2009), lo que no necesariamente quiere decir que los individuos están altamente infectados o que tengan anemia. Una leve policromasia en aves sanas es normal y está comprendida entre 0,41% y 6,78% (Mitchell y Johns, 2008), o sea entre 41 y 678 policromatófilos por cada 10,000 eritrocitos analizados. Sin embargo, los resultados de este estudio muestran niveles de policromasia relativamente altos, entre 404 y 1904 policromatófilos, tanto en individuos con bajas intensidades de infección, como en individuos con altas intensidades. Por tal razón, es recomendable que en futuros estudios se incluyan otras variables que puedan explicar estos altos niveles de policromasia. En el caso del BPJ, estos niveles podrían estar relacionados a la altura sobre el nivel del mar.

6.3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La prevalencia de malaria aviar en el BPJ es alta en las especies más abundantes. La microscopía fue más sensible para este estudio de malaria aviar, sin embargo es recomendable el uso combinado de diagnósticos (por microscopía y por PCR), ya que las dos se complementan entre sí y permiten un estudio más profundo de la biología de los parásitos. Además para mejor diagnóstico se recomienda utilizar métodos como el PCR cuantitativo.

En el Bosque Protector Jerusalem una mayor prevalencia de malaria aviar a nivel de especies podría estar relacionada a un mayor peso corporal, mayor abundancia, menor altura de forrajeo y mayor gregarismo. No se encontraron relaciones con el dimorfismo sexual. Las

especies con mayor prevalencia, son también las que presentaron mayor intensidad de infección. En las especies más comunes, no se encontró relación entre la intensidad de infección, y los factores condición física y policromasia.

Se recomienda extender este estudio en un rango geográfico más amplio, con una intensidad de muestreo mayor, y también a una mayor escala temporal, para entender mejor los patrones de infección. Se recomienda trabajar en equipos multidisciplinarios, principalmente con entomólogos que estudien a los vectores de la enfermedad, con microbiólogos que describan detalladamente la morfología y genética de los parásitos, y con veterinarios que analicen más detalladamente la condición del hospedero. También se recomienda estudiar a los hospederos con mayores prevalencias a largo plazo para observar el daño que causa la enfermedad y las interacciones parásito-hospedero que les permiten seguir siendo abundantes, pese a sus altas tasas de infección. Así mismo se recomienda muestrear aves domésticas en zonas aledañas al área de estudio para estudiar el posible intercambio de parásitos con las aves silvestres. Adicionalmente se sugiere que se estudie el impacto que es causado por el factor antropogénico ya que podría estar influenciando a que las aves tiendan a tener mayor prevalencia. Se sugiere que para asegurarse de una posible relación entre peso y abundancia se realicen análisis utilizando los pesos de cada especie.

7. LITERATURA CITADA

- Aikawa, M., Hepler, P., Huff, C. y Sprinz, H. 1986. The feeding mechanism of avian malarial parasites. *The Journal of Cell Biology* 28: 355-373.
- Alarcón, D., Whiteman, N., Parker, P.G., Ricklefs, R. y Valkiūnas, G. 2008. Patterns of Parasite Abundance and Distribution in Island Populations of Galápagos Endemic Birds. *Journal of Parasitology* 94 (3): 584-590.
- Altizer, S., Dobson, A., Hosseini, P., Hudson, P., Pascual, M. y Rohani, P. 2006. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters* 9: 467-484.
- Anderson, R.M. y May, R.M. 1979. Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature* 280: 361-367.
- Anderson, R.M. y May, R.M. 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 291:451-524.
- Ashford, R.W., Green, E.E., Holmes, P.R. y Lucas, A.J. 1991. *Leucocytozoon toddi* in British sparrowhawks *Accipiter nisus*: Patterns of infection in nestlings. *Journal of Natural History* 25(2): 269-277.
- Astudillo, V.G., Hernandez, S.M., Kistler, M.W., Boone, S.L., Lipp, E.K., Shresta, S. y Yabsley, M.J. 2013. Spatial, temporal, molecular, and intraspecific differences of haemoparasite infection and relevant selected physiological parameters of wild birds in Georgia, USA. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 2: 178-189.

- Atkinson, C.T, LaPointe, D.A. 2009. Introduced Avian Diseases, Climate Change, and the Future of Hawaiian Honeycreepers. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 23(1):53-63.
- Atkinson, C.T., Thomas, N.J. y Hunter, B. 2008. Parasitic Diseases of Wild Birds. *Parasitic Diseases of Wild Birds*, 1-53.
- Atkinson, C.T. y van Riper III, C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon, and Haemoproteus. En Loye, J. E. y Zuk, M. (eds.). *Bird-Parasite Interactions* pp.19-48. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Baptista, L.F., Trail, P.W. y Horblit, H.M. 1997. Family Columbidae. En: del Hoyo, J., Elliott, A. & Sargatal, J. (eds.) *Handbook of the birds of the world* 9 pp 60-244. Lynx Edicions. Barcelona, España.
- Basto, N., Rodríguez, O., Marinkelle, C., Gutierrez, R. y Matta, N. 2006. Hematozoarios e aves del Parque Nacional Natural La Macarena (Colombia). *Caldasia* 28(2): 371-377.
- Bennett, G.F. y Fallis. A.M. 1960. Blood parasites of birds in Algonquin Park, Canada, and a discussion of their transmission. *Canadian Journal of Zoology* 38:261-273.
- Bennett, G.F., Caines, J.R. y Bishop, M.A. 1988. Influence of blood parasites on the body mass of passeriform birds. *Journal of Wildlife Diseases* 24(2): 339-343.
- Bennett, G.F. y Pierce, M.A. 1988. Morphological form in the avian Haemoproteidae and an annotated checklist of the genus *Haemoproteus*. *Journal of Natural History* 22: 1683-1696.

- Bennett, G.F. y De Souza Lopes, O. 1980. Blood parasites of some birds from São Paulo State, Brazil. *Memoria Instituto Oswaldo Cruz* 75: 117–134.
- Bensch, S., Sterjman, M., Hasselquist, D., Östman, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H. y Torres, R. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *The Royal Society* 267: 1583-1589.
- Brown, C.R., Komar, N., Quick, S.B., Sethi, R.A., Panella, N.A., Brown, M.B. y Pfeffer, M. 2001. Arbovirus infection increases with group size. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 268:1833-1840.
- Brüning-Richardson, A. y McConkey, A. 2005. RNAi in the Malaria Parasite *Plasmodium*. En *Gene Silencing by RNA Interference Technology and Application*. Eds. M. Sohail.
- Camacho-Escobar, M.A., Pérez-Lara, E., Arroyo-Ledezma, J., Sánchez-Bernal, E.I. y Jiménez-Galicia, M.M. 2009. Guajalotes de traspato como reservorios de enfermedades de aves domésticas y silvestres en tres ecosistemas de la costa mexicana. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 109-115.
- Carvajal-Campos, A. 2009. Reproducción y Dieta de la Lagartija Andina *Stenocercus guentheri* (Squamatha: Iguania) en el Parque Protector Jerusalem. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Chastel, O., Weimerskirch, H. y Jouventin, P. 1995. Influence of body condition on reproductive decision and reproductive success in the blue petrel. *The Auk* 122 (4): 964-972.

- Collar, N.J. y Newton, I. 2010. Family Fringillidae. En: del Hoyo, J., Elliott, A. y Sargatal, J. (eds.) Handbook of the birds of the world 9 pp 440-616. Lynx Edicions. Barcelona, España.
- Cosgrove, C.L., Wood, M.J., Day, K.P. y Sheldon, B.C. 2008. Seasonal variation in Plasmodium prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. Journal of Animal Ecology 77: 540-548.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. y Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9: 772.
- Durrant, K.L., Beadell, J.S., Ishtiaq, F., Graves, G.R. Olson, S.L., Gering, E., Pierce, M.A., Milensky, C.M., Schmidt, B.K., Gebhard, C. y Fleicher, R.C. 2006. Avian Hematozoa in South America: a Comparison of Temperate and Tropical Zones. Ornithological Monographs No. 60:98-111.
- Ericson, P.G.P., Anderson, C.L., Britton, T., Elzanowski, A., Johansson, U.S., Källersjö, M., Ohlson, J.I., Parsons, T.J., Zuccon, D. y Mayr, G. 2006. Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. Biol. Lett. 2: 543-547.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Fitzpatrick, J.W. 2004. Family Tyrannidae. En: del Hoyo, J., Elliott, A., y Sargatal, J. (eds.) Handbook of the birds of the world 9, pp 170-462. Lynx Edicions. Barcelona, España.
- Freed, L.A. 1999. Extinction and endangerment of Hawaiian Honeycreepers: a comparative approach, p.137-162. En Landweber, L.F. y Dobson, A.P. Genetics and the Extinction

- of Species: DNA and the Conservation of Biodiversity. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Freed, L.A., Cann, R.L., Goff, M.L., Kuntz, W.A. y Bodner, G.R. 2005. Increase in avian malaria at upper elevation in Hawaii. *Condor* 107: 753-764.
- Gálvez, C., Ramírez, G. y Osorio, J. 2009. El laboratorio clínico en hematología de aves exóticas. *Biosalud* 8: 178-188.
- González, A.D., Matta, N.E., Ellis, V.A., Miller, E.T., Ricklefs, R.E. y Gutiérrez, H.R. 2014. Mixed species flock, nest height, and elevation partially explain avian haemoparasite prevalence in Colombia. *PloS one* 9(6): e100695.
- Greeney, H.F., Martin, P.R., Dobbs, R.C., Gelis, R.A., Bucker, A. y Montag, H. 2008. Nesting ecology of the spectacled whitestart in Ecuador. *Ornitología Neotropical* 19: 335-344.
- Guerrón, M., Orellana, A., Loor, A. y Zambrano, J. 2005. Studies in the protected dry forest Jerusalem. *Lyonia* 8: 5-18.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C. y Yuri, T. 2008. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320: 1763-1768.
- Hamilton, W.D. y Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites? *Science* 218:384-387.

- Harrigan, R.J., Sedano, R., Chasar, A.C., Chaves, J.A., Nguyen, J.T., Whitaker, A. y Smith, T.B. 2014. New host and lineage diversity of avian haemosporidia in the northern Andes. *Evolutionary applications* 7(7): 799-811.
- Hauptmanova, K., Benedikt, V. y Literák, I. 2006. Blood parasites in passerine birds in Slovakian East Carpathians. *Acta protozoológica* 45(1): 105.
- Hellgren, O., Pérez-Tris, J. y Bensch, S. 2009. A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. *Ecology*, 90(10), 2840-2849.
- Hilty, S.L. 2011. Family Thraupidae. En: del Hoyo, J., Elliott, A. y Sargatal, J. (eds.) *Handbook of the birds of the world* 16, pp 428-682. Lynx Edicions. Barcelona, España.
- Íñigo-Elías, E.E. y Enkerlin-Hoeflich, E.C. 2002. Amenazas, estrategias e instrumentos para la conservación de las aves, pp 86-132. En: Gómez de Silva, H., y Oliveras de Ita, A., *Conservación de aves experiencias en México*. Cipamex, México D.F., México.
- Ishak, H.D., Dumbacher, J.P., Anderson, N.L., Keane, J.J., Valkiūnas, G., Haig, S.M., Tell, L.A. y Sehgal, R.N. 2008. Blood parasites in owls with conservation implications for the spotted owl (*Strix occidentalis*). *PloS one*, 3(5): e2304.
- Jahn, O., Vargas-Grefa, E.E. y Schuchmann, K.L. 1999. The life history of the Long-wattled Umbrellabird *Cephalopterus penduliger* in the Andean foothills of north-west Ecuador: leks, behaviour, ecology and conservation. *Bird Conservation International* 9:81-94.

- Jarvi, S.I., Schultz, J.J. y Atkinson, C.T. 2002. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. *Journal of parasitology*: 88(1): 153-158.
- Jovani, R. y Tella, J.L. 2006. Parasite prevalence and sample size: misconceptions and solutions. *Trends in parasitology* 22(5): 214-218.
- Kitaysky, A.S., Wingfield, J.C. y Piatt, J.F. 1999. Dynamics of food availability, body condition and physiological stress response in breeding black-legged kittiwakes. *Functional Ecology* 13(5): 577-584.
- Kroodsma, D. y Brewer, D. 2005. Family Troglodytidae. En: del Hoyo, J., Elliott, A., y Sargatal, J. (eds.) *Handbook of the birds of the world*, 10 pp 356-447. Lynx Edicions. Barcelona, España
- Kudo, R. 1972. *Protozoología*, Compañía Editorial Continental, S. A., México, D.F., México.
- Loiseau, C., Iezhova, T., Valkiūnas, G., Chasar, A., Hutchinson, A., Buermann, W., Smith, T.B. y Sehgal, R. N. 2010. Spatial variation of haemosporidian parasite infection in African rainforest bird species. *Journal of Parasitology*, 96(1): 21-29.
- Lombeida, D. 2009. *Componente Ornitofauna*. En Burneo, S. F., M. A. Camacho, D. Lombeida, M. Bustamante y Bustos, A. *Evaluación Faunística Del Bosque Protector Jerusalem*. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Londoño, A., Pulgarin-R, P.C. y Blair, S. 2007. Blood Parasites in Birds from the Lowlands of Northern Colombia. *Caribbean Journal of Science* 43: 87-93.

- MAE (Ministerio del Ambiente del Ecuador). 2013. Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. Subsecretaría de Patrimonio Natural, Quito.
- Maddison, W.P. y Maddison, D.R., 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis ver. 2.75 [En línea]. <http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>.
- Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J. y De Lope, F. 2008. Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *Journal of evolutionary biology* 21(4): 979-987.
- Marzal, A., Asghar, M., Rodríguez, L., Reviriego, M., Hermosell, I.G., Balbontín, J., García-Longoria, L., de Lope, F. y Bensch, S. 2013. Co-infections by malaria parasites decrease feather growth but not feather quality in house martin. *Journal of Avian Biology*, 44(5): 437-444.
- Merino, S., Potti, J. y Fargallo, J.A. 1997. Blood parasites of passerine birds from central Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(3): 638-641.
- Midford, P.E., Garland Jr.T. y Maddison, W.P. 2005. PDAP package of Mesquite. ver. 1.07. Disponible en http://www.mesquiteproject.org/pdap_mesquite/index.html.
- Mitchell, E.B. y Johns, J. 2008. Avian Hematology and related disorders. *Veterinary Clinics Exotic Animal Practice* 11: 501-522.
- Möens, M.A.J. 2010. Diversity and specificity of avian malaria parasites in a lowland tropical rainforest in southeast Ecuador. Tesis de Maestría. Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Madrid, España.

- Munro, H.J. Martin, P.R., Moore, I.T. y Bonier, F. 2009. Blood parasites in adult and nestling birds in the Ecuadorian Andes. *Ornitología Neotropical* 20: 461-465.
- Ortiz-Crespo, F. 2003. Los colibríes: historia natural de unas aves casi sobrenaturales. Imprenta Mariscal, Quito, Ecuador.
- Paca-Condori, A. 2012. Prevalencia de malaria en colibrís (Trochilidae) en los bosques montanos del sur de Ecuador. Tesis de Maestría. Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Madrid, España.
- Pérez-Tris, J., Hasselquist, D., Hellgren, O., Krizanauskiene, A., Waldenström, J. y Bensch, S. 2005. What are malaria parasites?. *Trends in Parasitology* 21: 209-211.
- Poulin, R. y Forbes, M. R. 2012. Meta-analysis and research on host–parasite interactions: Past and future. *Evolutionary Ecology* 26:1169-1185.
- Ricklefs, R.E. 1992. Embryonic development period and the prevalence of avian blood parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 4722-4725.
- Ricklefs, R.E., Fallon, S.M. y Bermingham, E. 2004. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. *Systematic Biology* 53(1): 111-119.
- Ricklefs, R.E., Swanson, B.L., Fallon, S.M., Martínez-Abraín, A., Scheuerlein, A., Gray, J. y Latta, S.C. 2005. Community Relationships of Avian Malaria Parasites in Southern Missouri. *Ecological Monographs* 75: 543-559.
- Ridgely, R.S. y P.J. Greenfield. 2001. *The Birds of Ecuador*. Cornell University Press, Ithaca, New York, Estados Unidos.

- Rising, J., Jaramillo, A., Copete, J.L., Madge, S. y Ryan, P. 2011. Family Emberizidae. En: del Hoyo, J., Elliott, A., y Sargatal, J. (eds.) Handbook of the birds of the world, 16 pp 428-682. Lynx Edicions. Barcelona, España
- Rodríguez, O.A., Moya, H. y Matta, N.E. 2009. Avian blood parasites in the National Natural Park Chingaza: high Andes of Colombia. El Hornero, 24: 1-6.
- Saggese, D. 2007. Medicina de la conservación, enfermedades y aves rapaces. Hornero 22(2): 117-130.
- Schauensee, R.M. y Phelps, W.H. 1976. A guide to the Birds of Venezuela. Princeton University Press. Princeton, Estados Unidos.
- Schuchmann, K.L. 1999 Family Trochilidae. En: del Hoyo, J., Elliott, A. y Sargatal, J. (eds.) Handbook of the birds of the world, 5 pp 468-681. Lynx Edicions. Barcelona, España.
- Sol, D., Jovani, R. y Torres, J. 2003. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. Oecologia 135: 542-547.
- StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Subía, M.A. 2013. Comparación entomofaunística de tres sitios del Bosque Protector Jerusalén durante estaciones seca y lluviosa. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Suzan, G., Galindo, F. y Ceballos G. 2000. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. Vet. Mex. 31 (3): 223-230.

- Svensson-Coelho, M., Blake, J.G., Loiselle, B.A., Penrose, A.S., Parker, P.G. y Ricklefs, R.E. 2013. Diversity, prevalence, and host specificity of avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a western amazon assemblage. *Ornithological Monographs* 76: 1-47.
- Trujillo, F. y Trujillo, J. 2003. Guía de Vertebrados del Área de Recreación y Bosque Protector Jerusalem. Abya-Yala, Quito, Ecuador.
- Valkiūnas, G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., Križanauskienė, A., Palinauskas, V., Sehgal, R. N. y Bensch, S. 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology*, 94(6): 1395-1401.
- Vargas, R.R., Fontúrbel, F. E., Bonaccorso, E. y Simonetti, J.A. 2012. Reproductive life-history traits variation of birds in fragmented habitats: a review and meta-analysis. *Bird Conservation International* 22: 462–467.
- Ventim, R., Tenreiro, P., Grade, N., Encarnação, P., Araújo, M., Mendes, L., Pérez-Tris, J. y Ramos, J.A. 2012. Characterization of haemosporidian infections in warblers and sparrows at south-western European reed beds. *Journal of Ornithology* 153(2): 505-512.
- de Vries, T., Buitrón, G., Tobar, M., Piedrahita, P., Iglesias, A., Serrano, A., Erazo, M.J., Ojeda, I., Baquero, L. y Sánchez, P. 2012. Composición, estructura, densidad y aspectos socio-ecológicos de bandadas mixtas de aves de sotobosque y dosel en una

- parcela de 100 ha, Parque Nacional Yasuní, Amazonia Ecuatoriana. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 33 (1-2): 88-123.
- de Vries, T., Toscano, G. y Sánchez, P. 2014. Las aves y sus parásitos. *Nuestra Ciencias* 16: 7-10. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, PUCE, Quito, Ecuador.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist D. y Ostman, O. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90:191-194.
- Wilson, I.G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3741-3751.
- Young, B.E., Garvin, M.C. y McDonald, D.B. 1993. Blood parasites in Birds from Monteverde, Costa Rica. *Journal of Wildlife Diseases* 29: 555-560.
- Zwickl, D.J. 2006. Genetic Algorithm Approaches for the Phylogenetic Analysis of Large Biological Sequence Datasets Under Maximum Likelihood Criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

8. FIGURAS

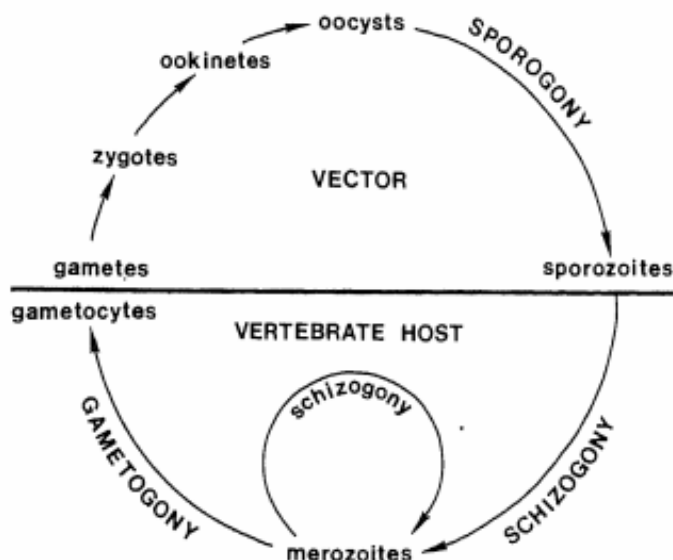


Figura 1. Ciclo de vida de un haemosporidio. La transmisión ocurre cuando el esporozoito entra en la sangre de un hospedero por la picadura de un vector. Los esporozoitos invaden los tejidos del hospedero, crecen y entran en esquizogonia (reproducción asexual) para producir merozoitos. Estos pueden invadir los eritrocitos y continúan con la esquizogonia (*Plasmodium* sp), o se desarrollan directamente en gametocitos (*Leucocytozoon* y *Haemoproteus*). Los tres géneros son luego transmitidos cuando son ingeridos por el vector. La gametogénesis ocurre en el intestino del vector para formar gametos los cuales se fusionan para formar cigotos fértiles. Los cigotos se transforman en ookinetos, los cuales penetran las células del epitelio del intestino medio. La esporogonia se produce en el ooquiste para producir numerosos esporozoitos infecciosos. Finalmente, los ooquistes maduros se mueven a través del haemocoele del vector a las glándulas salivares donde se quedan hasta la siguiente picadura de sangre (Atkinson y van Riper, 1991).

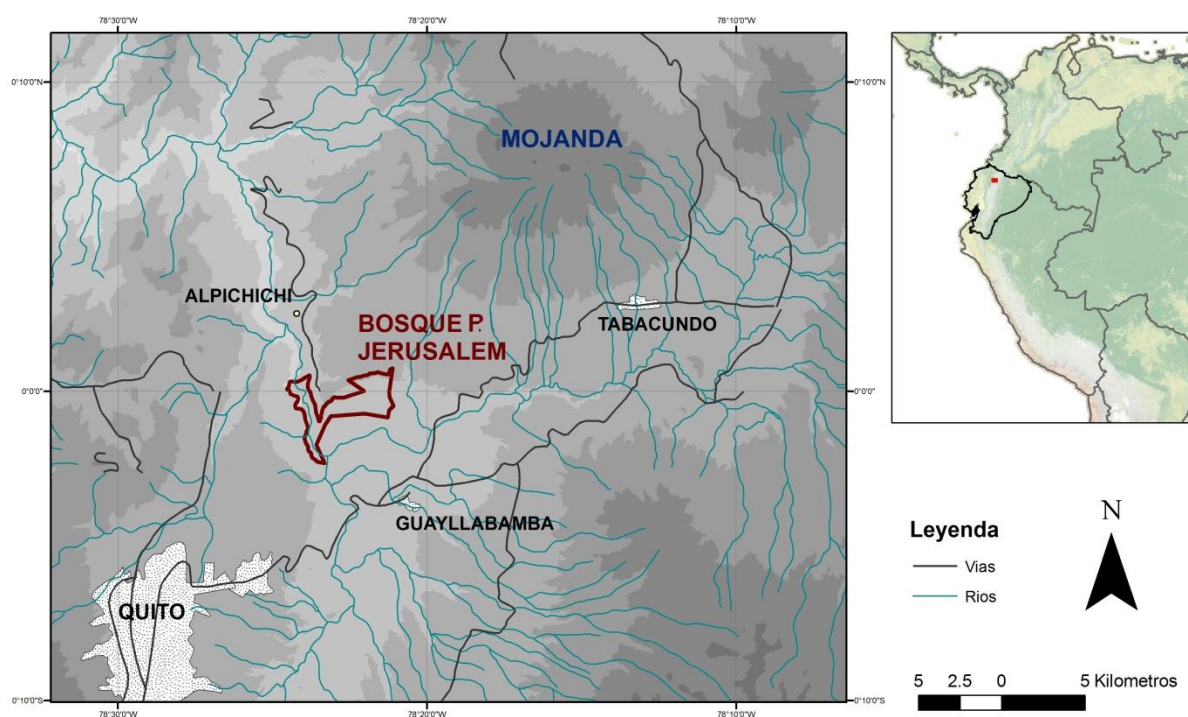


Figura 2. Ubicación geográfica del área de estudio. A la derecha se observa la ubicación a nivel regional.

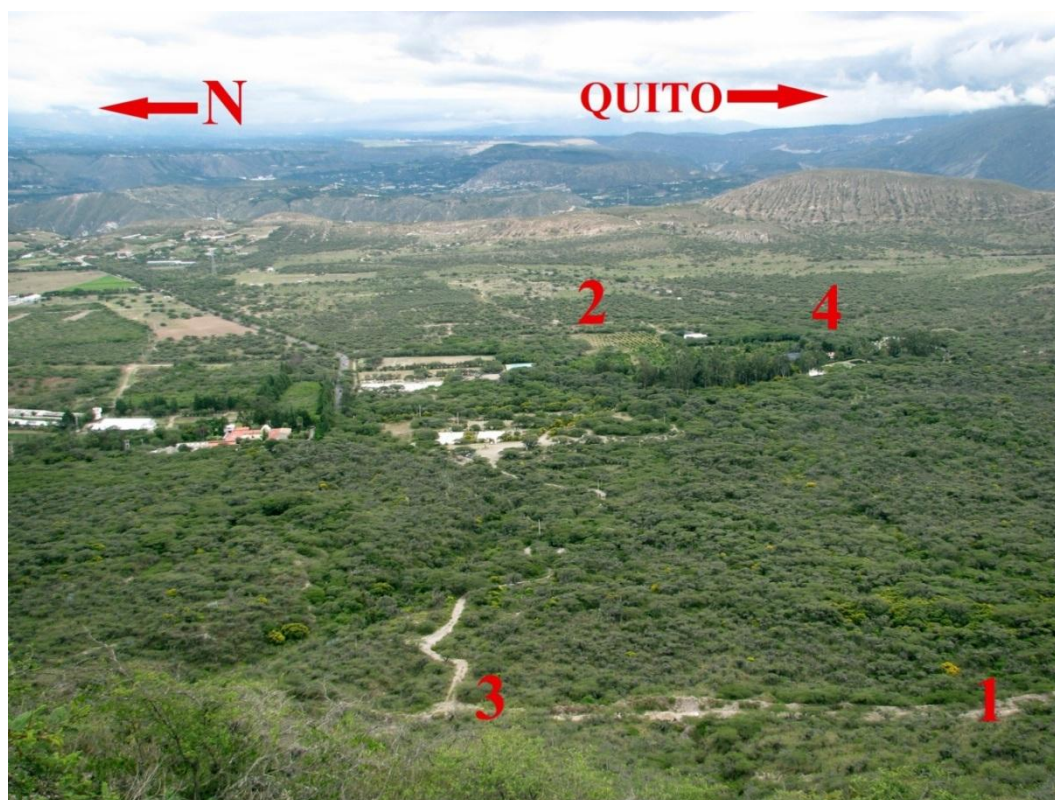


Figura 3. Puntos de muestreo dentro del BPJ. Los puntos (1, 2, 3, 4) muestran las zonas donde se colocaron las redes de neblina dentro del Parque Jerusalem. Zona 1: bajo la franja corta fuegos, Zona 2: vivero, Zona 3: sobre la franja corta fuegos, Zona 4: cerca de la carretera.



Figura 4. Recolección de datos. **a.** Red de neblina abierta en la zona 2 (Vivero); **b.** Proceso de pesaje de aves; **c.** Materiales para toma de datos, muestras de sangre y anillamiento. **d.** Toma de sangre con jeringuilla para insulina.

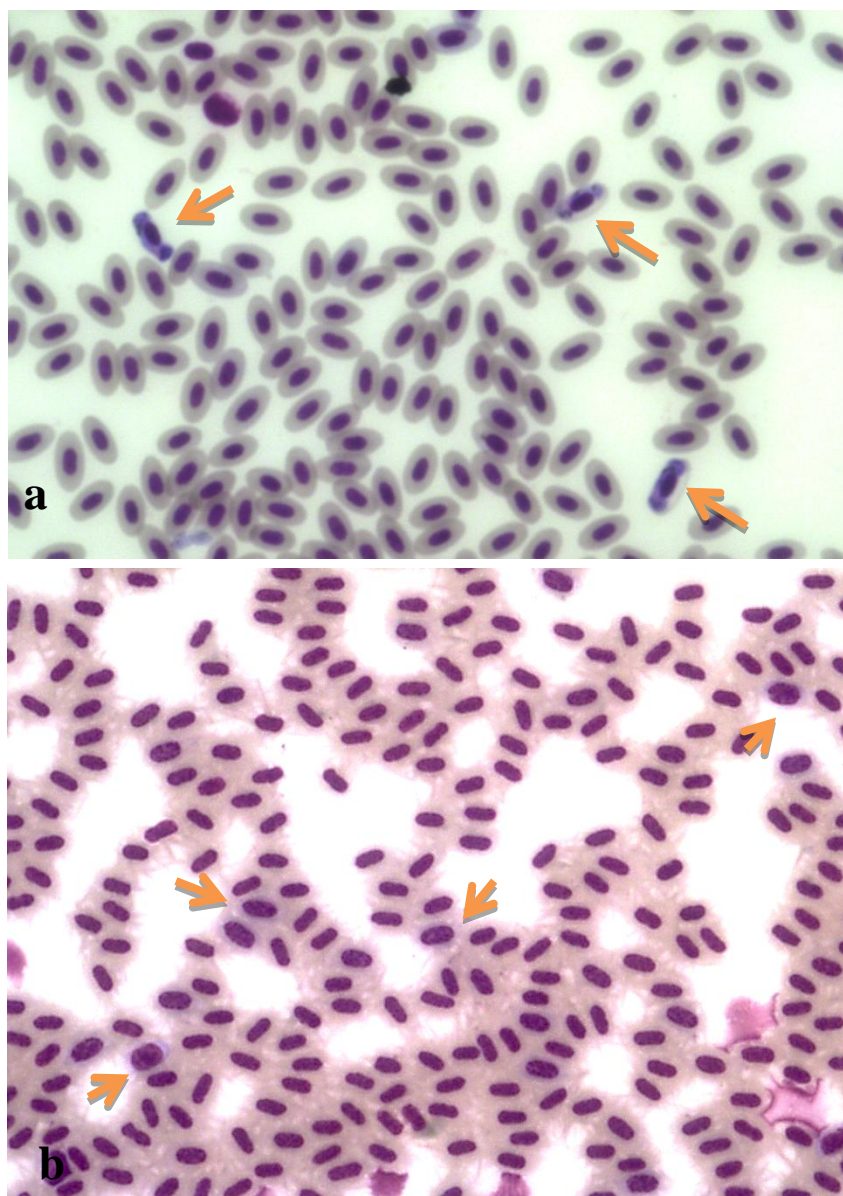


Figura 5. Frotis sanguíneos observados bajo microscopio a aumento de 40 x. **a.** Campo visual del frotis HFC 110 de *Phrygilus plebejus*, las flechas señalan las células infectadas (ejemplo de un individuo bastante infectado) se observan los gránulos de pigmento de los parásitos ocupando el lugar del citoplasma del eritrocito del ave. **b** Campo visual del frotis HFC 767 de *Colibri coruscans*, las flechas indican los policromatófilos. Se observa que los policromatófilos tienen el núcleo más grande (con respecto al citoplasma) y el citoplasma ligeramente más morado (ejemplo de un individuo sin infección).

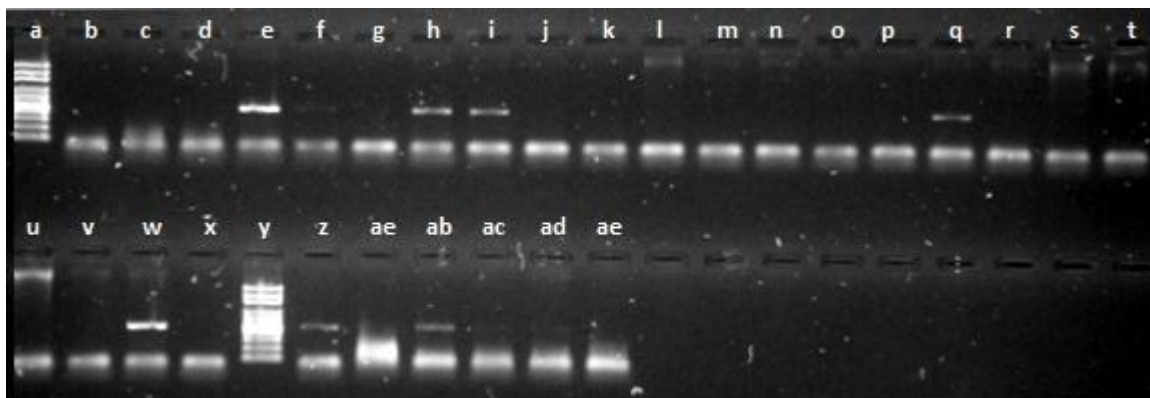


Figura 6. Producto de PCR en gel de Agarosa al 1%. **a.** Ladder; **b.** HFC-309 *Catamenia analis* negativo. **c.** HFC-442 *Troglodytes aedon* negativo. **d.** HFC-457 *Pyrocephalus rubinus* negativo. **e.** HFC-469 *Catamenia analis* positivo. **f.** HFC-476 *Phrygilus plebejus* negativo (positivo en microscopía) **g.** HFC-477 *Troglodytes aedon* negativo. **h.** HFC-488 *Troglodytes aedon* positivo. **i.** HFC-499 *Phrygilus plebejus* positivo. **j.** HFC-510 *Myrtis fanny* negativo. **k.** HFC-515 *Catamenia analis* negativo. **l.** HFC-519 *Colibri coruscans* negativo. **m.** HFC-523 *Phrygilus plebejus* negativo (positivo en microscopía). **n.** HFC-533 *Sporagra magellanica* negativo. **o.** HFC-539 *Pyrocephalus rubinus* negativo. **p.** HFC-544 *Colibri coruscans* negativo. **q.** HFC-560 *Phrygilus plebejus* positivo. **r.** HFC-574 *Pyrocephalus rubinus* negativo. **s.** HFC-576 *Colibri coruscans* negativo. **t.** HFC-581 *Sporagra magellanica* negativo (positivo en microscopía) **u.** HFC-584 *Phrygilus plebejus* negativo (positivo en microscopía). **v.** HFC-589 *Sporagra magellanica* negativo (positivo en microscopía). **w.** HFC-591 *Catamenia analis* positivo **x.** Control **y.** Ladder **z.** HFC-249 *Phrygilus plebejus* positivo **aa.** HFC-299 *Catamenia analis* negativo **ab.** HFC-360 *Phrygilus plebejus* positivo. **ac.** HFC-319 *Columbina passerina* negativo **ad.** HFC-346 *Troglodytes aedon* negativo. **ae.** Control

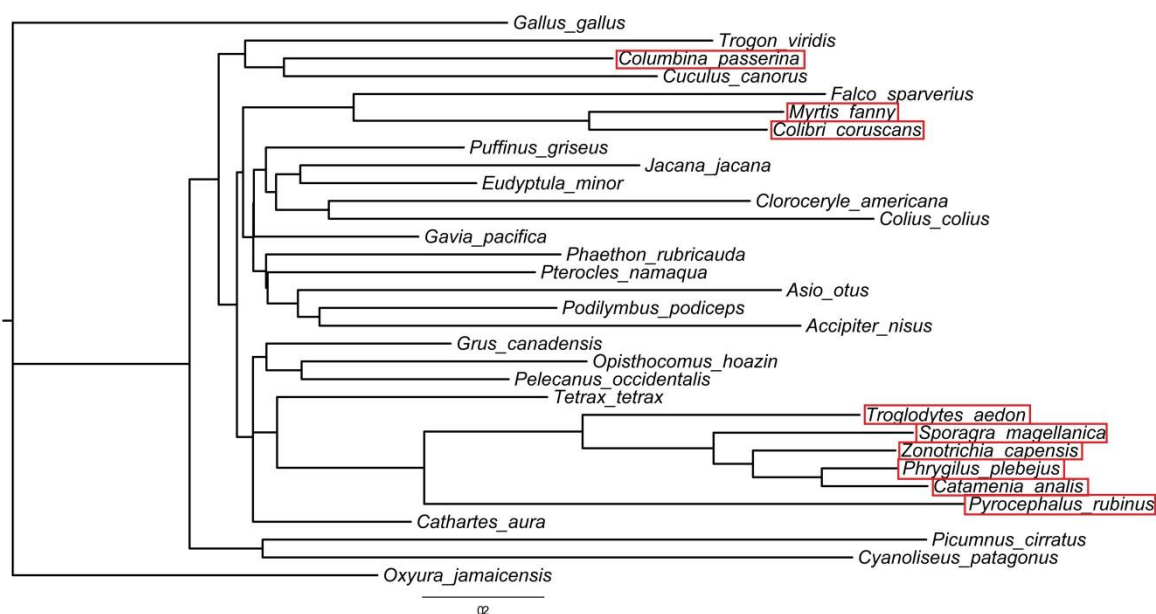


Figura 7. Filogenia del gen ND2. Filogenia hecha a partir de 1041 caracteres de 32 especies. Las nueve especies más comunes del BPJ se encuentran encuadradas.

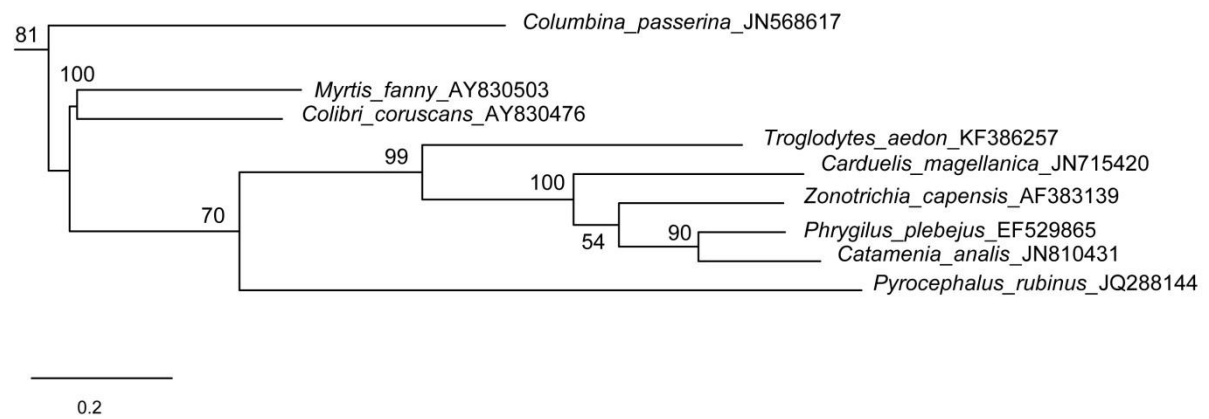


Figura 8. Árbol simplificado. Árbol filogenético en el que se muestran solo las ramas que conducen a las especies de interés. Se muestra la proporción de “bootstrap” obtenida para cada nodo de interés, obtenido en el análisis realizado para todas las especies.



Figura 9: Hospederos. En las especies con dimorfismo sexual se especifica: macho (M) y hembra (H); **a.** *Columbina passerina*, M izq., H der; **b.** *C. passerina* H; **c.** *C. passerina* M; **d.** *Colibri coruscans*; **e.** *Myrtis fanny* M; **f.** *M. fanny* H; **g.** *Pyrocephalus rubinus* M; **h.** *P. rubinus* H; **i.** *Troglodytes aedon*; **j.** *Phrygilus plebejus* H; **k.** *P. plebejus* M; **l.** *Catamenia analis* M; **m** *Catamenia analis* H; **n.** *Sporagra magellanica*, M izq., H der; **o.** *S. magellanica* M; **p.** *Zonotrichia capensis*.

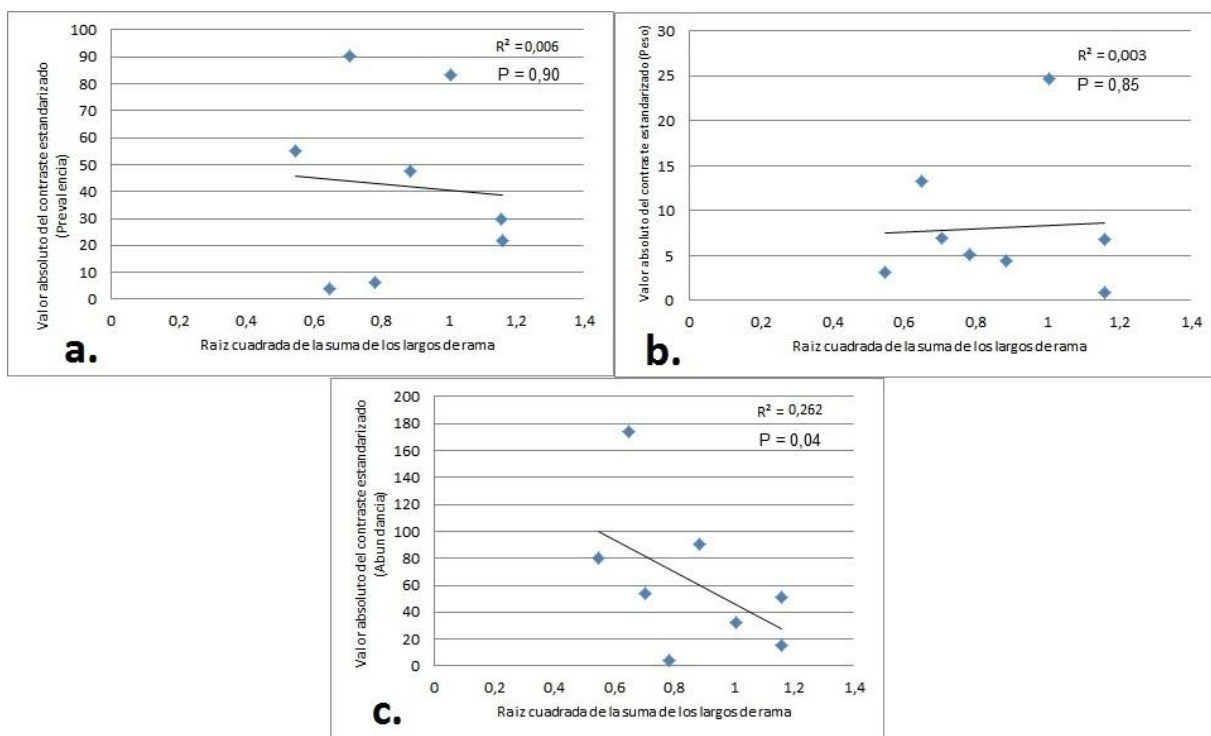


Figura 10: Correlación de Pearson para los análisis de relación de la estructura filogenética (raíz cuadrada de la suma de los largos de rama) con prevalencia, peso y abundancia (valor absoluto del contraste estandarizado). **a.** Correlación de prevalencia **b.** Correlación peso **c.** Correlación de abundancia.

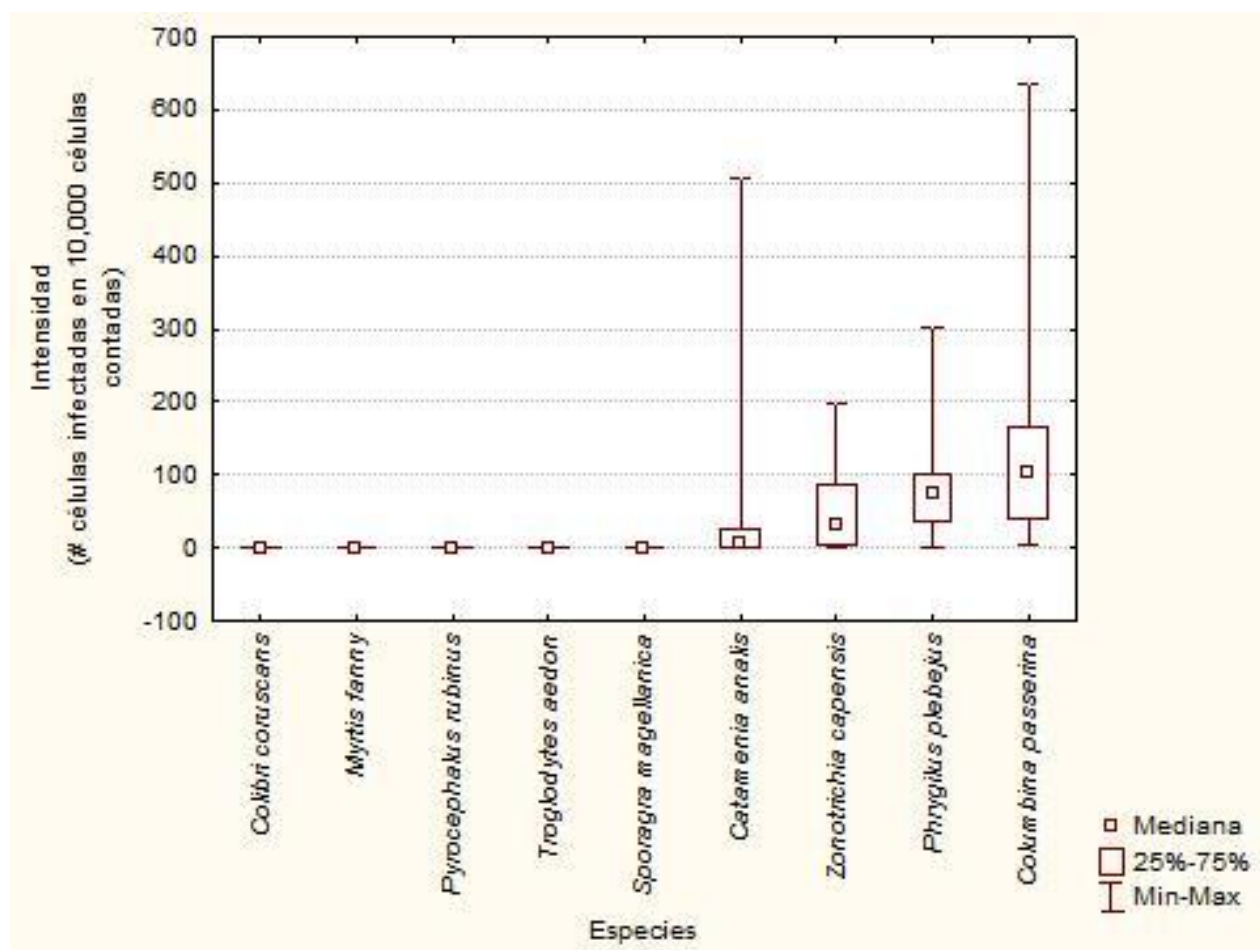


Figura 11. Comparación múltiple de intensidad por especie. El análisis de Kruskal-Wallis muestra la diferencia de intensidades entre especies (especies vs número de células infectadas). Se aprecia que para las especies infectadas la que mayor intensidad tiene es *Columbina passerina* mientras que la que menos intensidad tiene (a pesar de su rango tan alto) es *Catamenia analis*. Los porcentajes muestran en donde se ubican la mayoría de individuos dentro de cada especie con respecto al número de células infectadas.

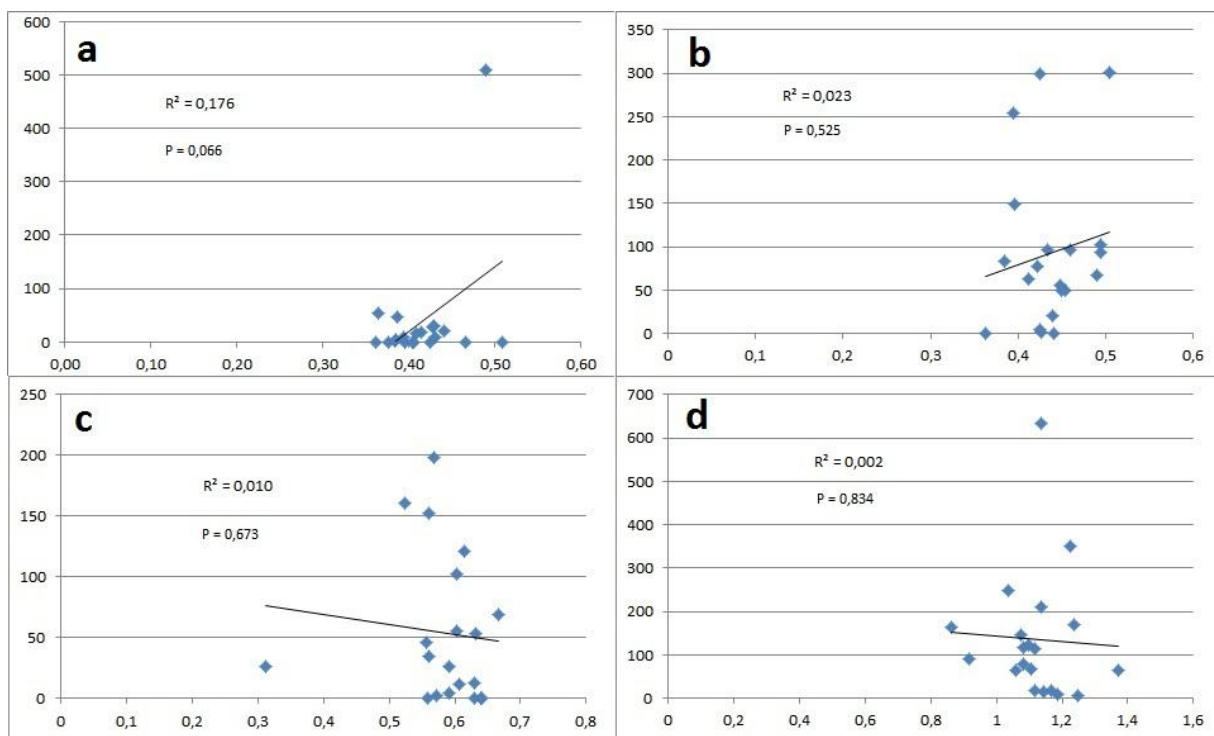


Figura 12. Correlaciones de Pearson entre intensidad y condición física por especie. el eje de las variables dependientes son el número de células infectadas para cada individuo mientras que el eje de las variable independientes son la condición física para cada individuo **a.** *Catamenia analis* $p = 0,066$. **b.** *Phrygilus plebejus* $p = 0,525$. **c.** *Zonotrichia capensis* $p = 0,673$. **d.** *Columbina passerina* $p = 0,834$.

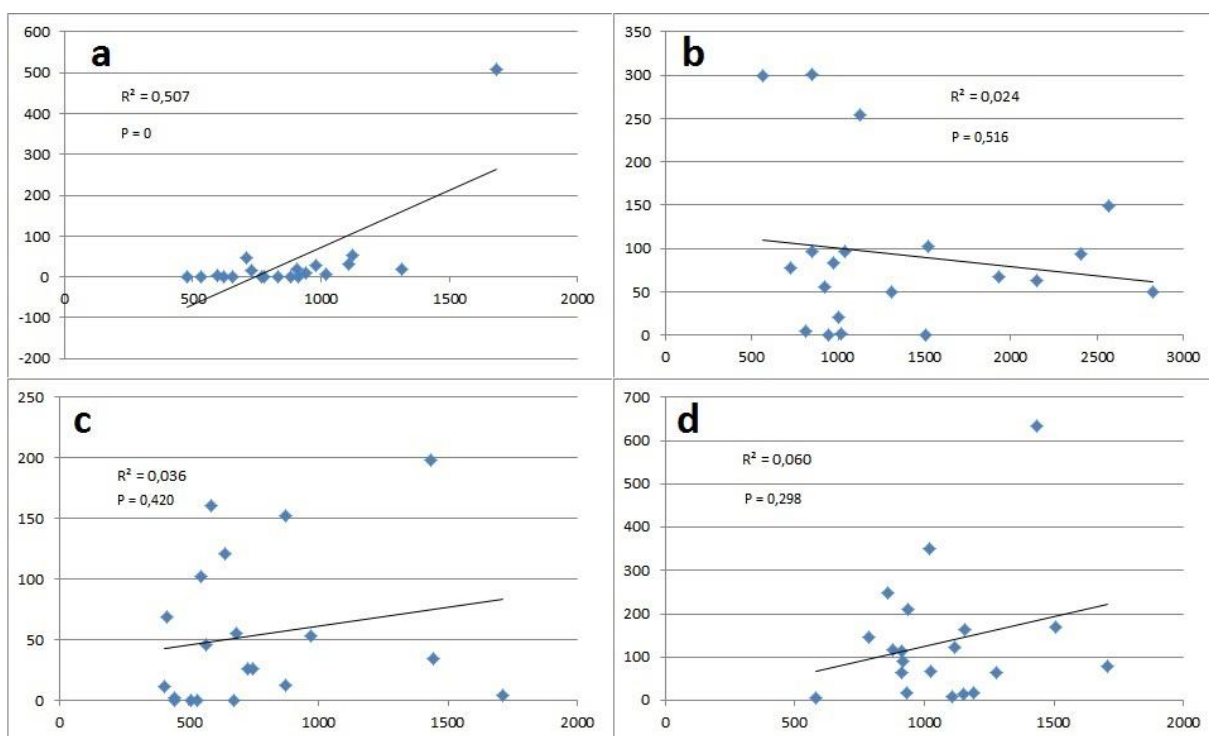


Figura 13. Correlaciones de Pearson entre la intensidad y el número de policromatófilos. El eje de las variables independientes es el número de policromatífilos de cada individuo mientras que el eje de las variable dependientes es el número de células infectadas de cada individuo. **a.** *Catamenia analis* $r^2 = 0,507$, $p = 0$. **b.** *Phrygilus plebejus* $r^2 = 0,024$, $p = 0,516$. **c.** *Zonotrichia capensis* $r^2 = 0,036$, $p = 0,42$. **d.** *Columbina passerina* $r^2 = 0,060$, $p = 0,298$.

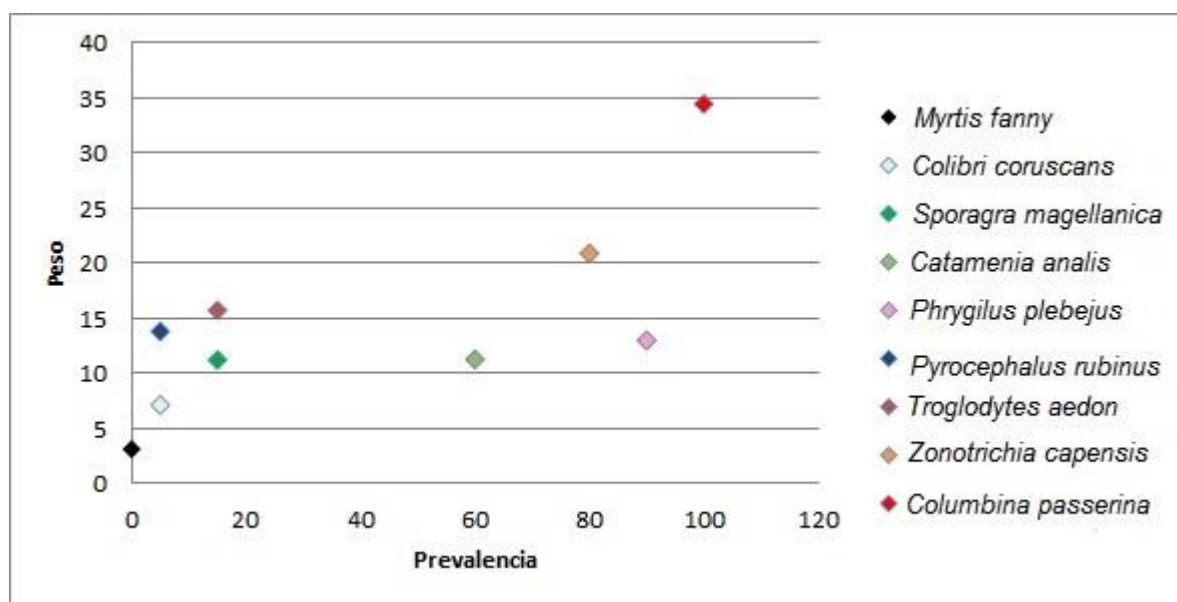


Figura 14. Relación entre Peso y Prevalencia. Se observa como a mayor peso mayor prevalencia.

9. TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de malaria. La tabla muestra la prevalencia de malaria aviar: a. por PCR, b. por microscopía y c. prevalencia máxima. Además se muestran los datos de intensidad de las infecciones por especie y por familia: d. Promedio de intensidades, e. desviación estándar f. rango de células infectadas en la especie

Especie	Familia	a. Prevalencia % (PCR)	b. Prevalencia % (microscopía)	c. Prevalencia máxima	Intensidad		
					d. Promedio	e. Desviación estándar	f. Rango
<i>Columbina passerina</i>	Columbidae	80	100	100	135,50	147,21	5–635
<i>Colibri coruscans</i>	Trochilidae	5	0	5	0	-	-
<i>Myrtis fanny</i>	Trochilidae	0	0	0	0	-	-
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	Tyrannidae	5	0	5	0	-	-
<i>Troglodytes aedon</i>	Troglodytida e	15	0	15	0	-	-
<i>Phrygilus plebejus</i>	Thraupidae	65	90	90	93,30	92,09	0–301
<i>Catamenia analis</i>	Thraupidae	35	60	60	37,15	112,00	0–508
<i>Sporagra magellanica</i>	Fringillidae	0	15	15	0,15	0,37	0–1
<i>Zonotrichia capensis</i>	Emberizidae	75	80	80	53,70	61,20	0–198

Tabla 2. Comparación múltiple de intensidad por especies. Los números en negrita muestran los valores altamente significativos (valor p)

	<i>Sporagra magellanica</i>	<i>Catamenia nalis</i>	<i>Colibri coruscans</i>	<i>Myrtis fanny</i>	<i>Phrygilus plebejus</i>	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	<i>Troglodytes aedon</i>	<i>Zonotrichia capensis</i>	<i>Columbina passerina</i>
<i>Sporagra magellanica</i>		0,768762	1,000000	1,000000	0,000095	1,000000	1,000000	0,006236	0,000002
<i>Catamenia nalis</i>	0,768762		0,167752	0,167752	0,597149	0,167752	0,167752	1,000000	0,059125
<i>Colibri coruscans</i>	1,000000	0,167752		1,000000	0,000006	1,000000	1,000000	0,000663	0,000000
<i>Myrtis fanny</i>	1,000000	0,167752	1,000000		0,000006	1,000000	1,000000	0,000663	0,000000
<i>Phrygilus plebejus</i>	0,000095	0,597149	0,000006	0,000006		0,000006	0,000006	1,000000	1,000000
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	1,000000	0,167752	1,000000	1,000000	0,000006		1,000000	0,000663	0,000000
<i>Troglodytes aedon</i>	1,000000	0,167752	1,000000	1,000000	0,000006	1,000000		0,000663	0,000000
<i>Zonotrichia capensis</i>	0,006236	1,000000	0,000663	0,000663	1,000000	0,000663	0,000663		1,000000
<i>Columbina passerina</i>	0,000002	0,059125	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000	1,000000	

10. ANEXOS

Anexo 1. Número de individuos capturados por especie y recapturas. Se muestra el número de individuos colectados por especies y recapturas, por 36288 horas red. En negrita se muestran las especies que fueron utilizadas en este estudio.

No.	Especie	Número de Individuos	Numero de recapturas
1	<i>Columbina passerina</i>	107	18
2	<i>Leptotila verreauxi</i>	2	0
3	<i>Systellura longirostris</i>	1	0
4	<i>Colibri coruscans</i>	38	0
5	<i>Lesbia victoriae</i>	17	0
6	<i>Patagona gigas</i>	3	0
7	<i>Myrtis fanny</i>	37	0
8	<i>Chaetocercus mulsant</i>	2	0
9	<i>Chlorostilbon melanorhynchus</i>	15	0
10	<i>Amazilia tzacatl</i>	13	0
11	<i>Piculus rivolii</i>	6	0
12	<i>Synallaxis azarae</i>	5	0
13	<i>Elaenia albiceps</i>	10	0
14	<i>Camptostoma obsoletum</i>	9	0
15	<i>Anairetes parulus</i>	3	0
16	<i>Myiophobus fasciatus</i>	3	0
17	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	32	4
18	<i>Myiotheretes striaticollis</i>	1	0
19	<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	7	0
20	<i>Troglodytes aedon</i>	31	11
21	<i>Thraupis bonariensis</i>	21	2
22	<i>Thraupis episcopus</i>	2	2
23	<i>Tangara vitriolina</i>	32	19
24	<i>Conirostrum cinereum</i>	26	8

Anexo 1. Número de individuos colectados por especie y recapturas. Se muestra el número de individuos colectados por especies y recapturas, por 36288 horas red. En negrita se muestran las especies que fueron utilizadas en este estudio.

No.	Especie	Número de Individuos	Numero de recapturas
25	<i>Diglossa sittoides</i>	11	0
26	<i>Phrygilus plebejus</i>	91	22
27	<i>Sporophila nigricollis</i>	8	2
28	<i>Sporophila sp.</i>	1	0
29	<i>Catamenia analis</i>	31	2
30	<i>Euphonia cyanocephala</i>	12	1
31	<i>Tiaris olivacea</i>	2	1
32	<i>Tiaris obscurus</i>	5	3
33	<i>Saltator striatipectus</i>	26	7
34	<i>Zonotrichia capensis</i>	226	48
35	<i>Pheucticus chrysogaster</i>	14	0
36	<i>Sporagra magellanica</i>	66	9
	TOTAL	916	159

Anexo 2. Protocolo para tinción GIEMSA. Pasos para teñir las placas de frotis sanguíneo con GIEMSA y poder visualizarlas en microscopio.

- 1) Fijar las placas con metanol 100% por aproximadamente 30 segundos y lavar con agua.
- 2) Poner en 1 l de agua destilada con 7,2 pH 1 g de fosfato de hidrógeno disódico y 0,7 g de dihidrógeno fosfato de potasio (preparación buffer).
- 3) Añadir 10 ml de solución estándar GIEMSA a 100 ml de la solución buffer con pH 7,2
- 4) Agregar a las placas esta solución para su tinción por 1 a 20°C.
- 5) Transcurrido ese tiempo lavar las placas con agua y secar al aire libre.

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN con tiocianato de guanidina para muestras de sangre de aves - ExtADN01. El protocolo se lleva a cabo en 3 días.

DÍA 1:

PRE-TRATAMIENTO PARA MUESTRAS DE SANGRE:

- 1) Las muestras están en alcohol. Tomar 1 mL de la muestra, con la mayor cantidad posible de sangre suspendida en ellas y verter en tubos eppendorf de 1.5 mL opacos.
- 2) Centrifugar para que la sangre forme un pellet.
- 3) Retirar totalmente el alcohol por decantación o con la pipeta.

LISIS CELULAR E INACTIVACIÓN DE NUCLEASAS:

- 1) Calentar el Buffer de Lisis para disolver de nuevo el SDS (menos de 1 min en el microondas o a 55 °C en la estufa.
- 2) Añadir 300 µL de Buffer de Lisis.
- 3) Añadir 3 µL de una solución de proteinasa K (20 mg/mL). (La proteinasa K se encarga de denaturar las nucleasas y otras proteínas incrustadas en la membrana celular)
- 4) Mezclar con vortex y asegurarse de que todo el tejido esté en la solución. (se puede hacer un spin down para obligar a bajar pedazos de tejido que estén en las paredes).
- 5) Incubar las muestras a 55 °C con agitación 600 rpm hasta el día siguiente.

DÍA 2

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS:

- 1) Añadir 4 µL de solución de RNAsa A y mezclar.
- 2) Añadir 100 µL de la Solución de Precipitación de Proteínas y mezclar con vórtex por 10-20 segundos.
- 3) Centrifugar por 10 min a 13000 rpm.

4) Decantar el sobrenadante en tubos de segunda fase (eppendorf de 1.5 mL transparentes) y descartar el resto.

11.2.2.2. PRECIPITACIÓN DE ADN:

1) Añadir 300 μ L de isopropanol frío y mezclar con cuidado invirtiendo los tubos varias veces.

2) Centrifugar a 13000 rpm por 10 min.

3) Descartar el sobrenadante.

4) Añadir 300 μ L de etanol al 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el pellet.

5) Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante.

6) Dejar que el pellet se seque en el tubo, dejando éste abierto a temperatura ambiente.

7) Añadir 100 μ L de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 resuspender el pellet y guardar a 4 °C hasta el día siguiente.

DÍA 3

PRECIPITACIÓN Y LAVADO DEL ADN:

1) Añadir 10 μ L de NaOAc 3M y mezclar invirtiendo los tubos. (El acetado de sodio ayuda a precipitar el ADN).

2) Añadir 100 μ L de isopropanol frío y mezclar invirtiendo los tubos varias veces.

3) Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante.

4) Lavar el pellet con 300 μ L de etanol al 70% y mezclar invirtiendo los tubos.

5) Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante.

6) Dejar que el pellet se seque en el tubo, dejando éste abierto a temperatura ambiente.

7) Resuspender el pellet en 50 μ L de TE 0.1 M, pH 8.0.

8) Guardar a – 20 °C.

Anexo 4. Composición del “coctel” de PCR y programa de amplificación.

PCR A PARTIR DE DILUCIONES AL 50% DE ADN

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)	Concentración final
Agua		11.75	
Buffer	10X	2.5	1X
MgCl ₂	50 mM	1.5	3 mM
dNTPs	10 mM	1	0.4 mM
Primer F	10 μM	1.5	0.6 μM
Primer R	10 μM	1.5	0.6 μM
Taq	5 U/μL	0.25	0.05 U/ μL
ADN		5	
TOTAL		25	

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94 °C	3'	X 1
Denaturación	94 °C	30"	X 37
Annealing	50 °C	30"	
Extensión	72 °C	45"	
Extensión final	72 °C	10'	X 1
	4 °C	∞	

PCR A PARTIR DE PRODUCTOS DE PCR (PCR DE PCR o PCR ANIDADO)

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)	Concentración final
Agua		18.25	
Buffer	10X	2.5	1X
MgCl ₂	50 mM	1.5	3 mM
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer F	10 μM	0.5	0.2 μM
Primer R	10 μM	0.5	0.2 μM
Taq	5 U/μL	0.25	0.05 U/ μL
ADN		1	
TOTAL		25	

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR ANIDADO

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94 °C	3'	X 1
Denaturación	94 °C	30''	X 20
Annealing	50 °C	30''	
Extensión	72 °C	45''	
Extensión final	72 °C	10'	X 1
	4 °C	∞	

Anexo 5. Lista de especies y sus secuencias de ND2 (número de acceso de GenBank), utilizadas en el análisis filogenético. En negrita se señalan las especies utilizadas para el presente estudio.

Especie	Número de acceso en GenBank
<i>Gallus gallus</i>	JQ970530
<i>Oxyura jamaicensis</i>	EU585721
<i>Podilymbus podiceps</i>	EU166972
<i>Grus canadensis</i>	EU166954
<i>Gavia pacifica</i>	EU166952
<i>Cathartes aura</i>	EU166946
<i>Eudiptula minor</i>	KJ455429
<i>Phaethon rubricauda</i>	EU166964
<i>Puffinus griseus</i>	KJ455615
<i>Pelecanus occidentalis</i>	JX683966
<i>Pterocles namaqua</i>	DQ385080
<i>Opisthocomus hoazín</i>	AY274300
<i>Cuculus canorus</i>	AY274060
<i>Jacana jacana</i>	DQ385086
<i>Falco sparverius</i>	NC008547
<i>Tetrax tetrax</i>	GU055936
<i>Columbina passerina</i>	JN568617
<i>Cloroceryle americana</i>	DQ111844
<i>Asio otus</i>	EU601055
<i>Trogon viridis</i>	EU603907
<i>Accipiter nisus</i>	AB246663
<i>Colibri_corus</i>	AY830476
<i>Myrtis fanny</i>	AY830503
<i>Colius colius</i>	AY625194
<i>Carduelis magellanica</i>	JN715420
<i>Catamenia analis</i>	JN810431
<i>Phrygilus plebejus</i>	EF529865
<i>Zonotrichia capensis</i>	AF383139
<i>Troglodytes aedon</i>	KF386257
<i>Cyanoliseus patagonus</i>	KF017468
<i>Picumnus cirratus</i>	DQ479153
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	JQ288144

Anexo 6. Bibliografía de tres variables ecológicas por especie.

Especie	Altura Forrajeo	Dimorfismo	Gregarismo
<i>Columbina passerina</i>	Baptista <i>et al.</i> , 1997; Schauensee y Phelps, 1978	Baptista <i>et al.</i> , 1997	Baptista <i>et al.</i> , 1997; Schauensee y Phelps, 1978
<i>Colibri coruscans</i>	Schauensee y Phelps, 1978; Schuchmann, 1999	Schuchmann, 1999	Schuchmann, 1999
<i>Myrtis fanny</i>	Schuchmann, 1999	Schuchmann, 1999	Schuchmann, 1999
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	Fitzpatrick, 2004	Fitzpatrick, 2004	Schauensee y Phelps, 1978
<i>Troglodytes aedon</i>	Kroodsma y Brewer, 2005	Kroodsma y Brewer, 2005	Kroodsma y Brewer, 2005; Schauensee y Phelps, 1978
<i>Phrygilus plebejus</i>	Hilty, 2011	Hilty, 2011	Hilty, 2011
<i>Catamenia analis</i>	Hilty, 2011	Hilty, 2011	Hilty, 2011
<i>Sporagra magellanica</i>	Collar y Newton, 2010	Collar y Newton, 2010	Collar y Newton, 2010
<i>Zonotrichia capensis</i>	Rising <i>et al.</i> , 2011; Schauensee y Phelps, 1978	Ridgely, y Greenfield, 2001	Rising <i>et al.</i> , 2011; Schauensee y Phelps, 1978

Anexo 7. Número de células infectadas por individuo por especie

Individuo	Especie	Número de células infectadas
HFC 533	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 581	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 589	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 599	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 639	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 640	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 643	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 667	<i>Sporagra magellanica</i>	1
HFC 675	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 702	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 708	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 722	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 726	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 774	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 815	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 841	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 857	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 864	<i>Sporagra magellanica</i>	1
HFC 867	<i>Sporagra magellanica</i>	1
HFC 868	<i>Sporagra magellanica</i>	0
HFC 021	<i>Catamenia analis</i>	0
HFC 026	<i>Catamenia analis</i>	0
HFC 033	<i>Catamenia analis</i>	0
HFC 119	<i>Catamenia analis</i>	0
HFC 123	<i>Catamenia analis</i>	0

Continúa anexo 7 pag.81

Anexo 7. Número de células infectadas por individuo por especie

Individuo	Especie	Número de células infectadas
HFC 123	<i>Catamenia analis</i>	0
HFC 299	<i>Catamenia analis</i>	0
HFC 309	<i>Catamenia analis</i>	0
HFC 359	<i>Catamenia analis</i>	20
HFC 395	<i>Catamenia analis</i>	30
HFC 469	<i>Catamenia analis</i>	19
HFC 515	<i>Catamenia analis</i>	4
HFC 591	<i>Catamenia analis</i>	28
HFC 609	<i>Catamenia analis</i>	53
HFC 676	<i>Catamenia analis</i>	8
HFC 679	<i>Catamenia analis</i>	0
HFC 715	<i>Catamenia analis</i>	1
HFC 743	<i>Catamenia analis</i>	9
HFC 744	<i>Catamenia analis</i>	508
HFC 858	<i>Catamenia analis</i>	47
HFC 862	<i>Catamenia analis</i>	16
HFC 015	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 180	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 229	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 385	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 439	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 519	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 544	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 576	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 614	<i>Colibri coruscans</i>	0

Continúa anexo 7 pag.82

Anexo 7. Número de células infectadas por individuo por especie

Individuo	Especie	Número de células infectadas
HFC 617	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 636	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 665	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 701	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 725	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 767	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 777	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 811	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 816	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 827	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 840	<i>Colibri coruscans</i>	0
HFC 001	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 025	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 103	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 153	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 163	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 201	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 202	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 211	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 239	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 322	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 336	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 338	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 362	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 390	<i>Myrtis fanny</i>	0

Continúa anexo 7 pag.83

Anexo 7. Número de células infectadas por individuo por especie

Individuo	Especie	Número de células infectadas
HFC 510	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 632	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 669	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 678	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 724	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 828	<i>Myrtis fanny</i>	0
HFC 028	<i>Phrygilus plebejus</i>	97
HFC 110	<i>Phrygilus plebejus</i>	300
HFC 173	<i>Phrygilus plebejus</i>	77
HFC 227	<i>Phrygilus plebejus</i>	55
HFC 249	<i>Phrygilus plebejus</i>	102
HFC 273	<i>Phrygilus plebejus</i>	96
HFC 298	<i>Phrygilus plebejus</i>	50
HFC 303	<i>Phrygilus plebejus</i>	68
HFC 360	<i>Phrygilus plebejus</i>	50
HFC 417	<i>Phrygilus plebejus</i>	254
HFC 476	<i>Phrygilus plebejus</i>	94
HFC 499	<i>Phrygilus plebejus</i>	63
HFC 523	<i>Phrygilus plebejus</i>	0
HFC 560	<i>Phrygilus plebejus</i>	21
HFC 584	<i>Phrygilus plebejus</i>	1
HFC 677	<i>Phrygilus plebejus</i>	149
HFC 695	<i>Phrygilus plebejus</i>	301
HFC 741	<i>Phrygilus plebejus</i>	0
HFC 775	<i>Phrygilus plebejus</i>	84

Continua anexo 7 pag.84

Anexo 7. Número de células infectadas por individuo por especie

Individuo	Especie	Número de células infectadas
HFC 805	<i>Phrygilus plebejus</i>	4
HFC 036	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 050	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 104	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 242	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 291	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 397	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 450	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 457	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 539	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 574	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 604	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 646	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 682	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 703	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 752	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 758	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 780	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 793	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 819	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 848	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	0
HFC 158	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 170	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 197	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 329	<i>Troglodytes aedon</i>	0

Continúa anexo 7 pag.85

Anexo 7. Número de células infectadas por individuo por especie

Individuo	Especie	Número de células infectadas
HFC 342	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 346	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 358	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 442	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 477	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 488	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 620	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 642	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 683	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 732	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 734	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 747	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 821	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 823	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 849	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 859	<i>Troglodytes aedon</i>	0
HFC 3	<i>Zonotrichia capensis</i>	46
HFC 46	<i>Zonotrichia capensis</i>	53
HFC 118	<i>Zonotrichia capensis</i>	26
HFC 172	<i>Zonotrichia capensis</i>	102
HFC 204	<i>Zonotrichia capensis</i>	13
HFC 270	<i>Zonotrichia capensis</i>	12
HFC 283	<i>Zonotrichia capensis</i>	2
HFC 327	<i>Zonotrichia capensis</i>	26
HFC 410	<i>Zonotrichia capensis</i>	0

Continúa anexo 7 pag.86

Anexo 7. Número de células infectadas por individuo por especie

Individuo	Especie	Número de células infectadas
HFC 468	<i>Zonotrichia capensis</i>	0
HFC 524	<i>Zonotrichia capensis</i>	152
HFC 567	<i>Zonotrichia capensis</i>	0
HFC 624	<i>Zonotrichia capensis</i>	55
HFC 660	<i>Zonotrichia capensis</i>	161
HFC 685	<i>Zonotrichia capensis</i>	4
HFC 727	<i>Zonotrichia capensis</i>	198
HFC 750	<i>Zonotrichia capensis</i>	69
HFC 787	<i>Zonotrichia capensis</i>	0
HFC 813	<i>Zonotrichia capensis</i>	121
HFC 854	<i>Zonotrichia capensis</i>	34
HFC 18	<i>Columbina passerina</i>	5
HFC 56	<i>Columbina passerina</i>	118
HFC 102	<i>Columbina passerina</i>	19
HFC 169	<i>Columbina passerina</i>	350
HFC 221	<i>Columbina passerina</i>	113
HFC 319	<i>Columbina passerina</i>	90
HFC 344	<i>Columbina passerina</i>	210
HFC 394	<i>Columbina passerina</i>	170
HFC 424	<i>Columbina passerina</i>	65
HFC 493	<i>Columbina passerina</i>	8
HFC 537	<i>Columbina passerina</i>	67
HFC 566	<i>Columbina passerina</i>	145
HFC 596	<i>Columbina passerina</i>	79
HFC 630	<i>Columbina passerina</i>	635

Continúa anexo 7 pag.87

Anexo 7. Número de células infectadas por individuo por especie

Individuo	Especie	Número de células infectadas
HFC 672	<i>Columbina passerina</i>	16
HFC 674	<i>Columbina passerina</i>	19
HFC 693	<i>Columbina passerina</i>	124
HFC 709	<i>Columbina passerina</i>	249
HFC 756	<i>Columbina passerina</i>	164
HFC 855	<i>Columbina passerina</i>	64

Anexo 8. Secuencias de parásitos (Cadena, com. pers., Tesis en curso)

HAEMOPROTEUS

HFC_172 (*Zonotrichia capensis*)

TGCATGCTACTGGTGCTACATTTGTCTTTATTTTAACTTACTTACATATATTAAGAG
GATTAAATTATTCATATTCTTATTTACCTTTATCATGGATAACTGGACTAATAATAT
TCTTAATTTCTATTGTTACCGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGACAAATGA
GTTTCTGGGGTGCAACCGTTATTACTAATTTATTATATTTTATACCTGGACTTGTTT
CATGGATTTGTGGAGGATATACTATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTTTTTGTA
CTACATTTTATATTTCCCTTTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTCT
TACACTTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCT
TTCTATCCAAGTCTATTATGTCTAGATATCAAAGGATTTAATAATGTATTAKTCCT
ATTTCTAGCACAAAGTTTATTTGGAATTCTACCATT

PLASMODIUM

HFC_660 (*Zonotrichia capensis*)

TACAGGTGCTACATTTGTCTTTATTTTAACTTACTTACATATATTAAGAGGATTAA
ATTATTCATATTCTTATTTACCTTTATCATGGATAACTGGACTAATAATATTCTTAA
TTTCTATTGTTACCGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGACAAATGAGTTTCT
GGGGTGCAACCGTTATTACTAATTTATTATATTTTATACCTGGACTTGTTTCATGG
ATTTGTGGAGGATATACTATTAGTGATCCAACCTTTAAAAAGATTTTTTGTACTACA
TTTTATATTTCCCTTTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTCTTACAC
TTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCTTTCTA
TCCAAGTCTATTATGTCTAGATATCAAAGGATTTAATAATGTATTAGTCCTATTTC
TAGCACAAAGTTTATTTGGAATTCTACCATTA

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Daniela Carolina Bahamonde Vinueza, con C.I. 171590065-8, autora del trabajo de graduación intitulado “Prevalencia de Malaria Aviar en las aves comunes del Parque Recreacional-Bosque Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de

Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE en referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la universidad

Quito, 26 de Noviembre del 2014

Sra.....

DANIELA CAROLINA BAHAMONDE VINUEZA